

Der Einfluß der Linolensäurezufuhr auf die renale Prostaglandinbildung

Hans-Peter Schwemlein

Duss
München
1984

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München

Direktor Professor Dr. N. Zöllner

Der Einfluß der Linolensäurezufuhr
auf die renale Prostaglandinbildung

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hans-Peter Schwemlein

aus

Freising

Jahr

1984

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Wolfram
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. N. Zöllner
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 18.10.84.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A EINLEITUNG	1
B METHODIK	4
1. Radioimmunologische Bestimmung der Prostaglandine E_2 und $F_{2\alpha}$ im Urin	4
1.1 Prinzip der Meßmethode	4
1.2 Verwendete Reagenzien	4
1.3 Erstellen der Standardkurve	6
1.4 RIA	9
1.5 Flüssigkeitsszintillationszählung	10
1.6 Berechnung des Prostaglandin- Gehaltes von Urin	11
a) Ermittlung der PG-Menge in pg	11
b) Ermittlung der PG-Urinkonzen- tration in pg/ml	13
c) Ermittlung der täglichen PG- Ausscheidung in ng/d	14
1.7 Extraktion von Urin und Säulenchro- matographie der Prostaglandine	14
2. Zusammensetzung der Formeldiäten	16
3. Versuchsablauf	18
4. Versuchspersonen	19
C ERGEBNISSE	20
1. Überprüfung des Radioimmunoassays	20
1.1 binding (Bindung)	20
1.2 Sensitivität	22
1.3 Spezifität	23

1.4	Validität	26
1.5	Präzision	28
1.6	Recovery	28
1.7	Herstellung der Prostaglandin- Standardverdünnung	30
2.	Ergebnisse des Formeldiätversuchs	31
D	DISKUSSION	35
E	ZUSAMMENFASSUNG	44
F	ANHANG TABELLEN 1 - 15	45
G	ABBILDUNGEN 1 - 14	55
H	LITERATURVERZEICHNIS	67
	LEBENS LAUF	88

Verwendete Abkürzungen

A, PGA	Acid (Säure)
α	Alpha
	Mathematisch "absoluter Betrag"
Abb.	Abbildung
ADH	Antidiuretisches Hormon
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
B, PGB	Base / Bindung
% B ₀	Binding(Bindung), prozentuale Bindung des Antikörpers an das Antigen, definiert als Quotient aus Probenleerwert und totaler Aktivität mal 100 %.
% $\frac{B}{B_0}$	Prozentuale Verdrängung des markierten Antigens vom Antikörper durch nachzuweisendes Antigen, definiert als Quotient aus den für die einzelnen Substanzmengen gefundenen Zählraten und dem Probenleerwert mal 100 %.
β	Beta
BSA	Body Surface Area (Körperoberfläche)
ci	Curie
Co.	Company (Gesellschaft)
conc.	Concentration (Konzentration)
cpm	Counts per minute (registrierte Zerfälle pro Minute)

d	Tag
DHETE	Di-hydroxy-eicosa-tetraen-säure
dpm	Direct pulses per minute (tatsächliche Zerfälle pro Minute)
E, PGE	Ether (Äther) / Eiweiß
en	Energie (Nahrungs-)
eV	Elektronenvolt
F, PGF	Fosfat (Phosphat) / Fett
f	Femto (10^{-15})
FD	Formeldiät
γ	Gamma
g	Gramm
Gp.	Gelphos, Puffer mit Gelatine und einer Phosphorverbindung
γ -GT	Gamma-Glutamyltransferase
h	Stunde
^3H	Tritium, Isotop des Wasserstoffs
HCl	Salzsäure
HETE	Hydroxy-eicosa-tetraensäure
HPETE	Hydroxy-peroxy-eicosatetraensäure
HPLC	High-pressure-liquid-chromatography (Hochdruckflüssigkeitschromatographie)
kcal	Kilokalorien
KH	Kohlenhydrat
l	Liter
LW	Leerwert
m,mg,ml	Milli (10^{-3}), Milligramm, Milliliter
μ , μl	Mikro (10^{-6}), Mikroliter
M	Molar (-e Lösung)
min.	Minute

n, ng	Nano(10^{-9}), Nanogramm / statistisch "Anzahl"
N	Normal(-e Lösung) / Anzahl der noch nicht zerfallenen Kerne
N_0	Anzahl der am Anfang vorhan- denen Kerne
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
NaN_3	Natriumnitrid
ω	Omega (Stellung der "ersten" Dop- pelbindung der Fettsäuren, von der terminalen Methylgruppe, die ω 1 ist, gezählt)
p, pg	Piko (10^{-12}), Pikogramm
PG	Prostaglandin (e)
PG_2	Prostaglandine mit zwei Doppel- bindungen
PPO	2,5-Diphenyloxazol
POPOP	1,4-Di-2(-5-phenyloxazol)-benzol
RIA	Radioimmunoassay
S	Solventium(Lösungsmittelgemisch)
SC	Säulenchromatographie
$\pm$ S.D.	Standardabweichung
SRS-A	Slow-reacting substance of anaphylaxis
Tab.	Tabelle
TNPDA	Tetranorprostandisäure
TX	Thromboxan
V	Volumen
v/v	Volumenanteile
$\bar{x}$	Mittelwert
Z %	Entspricht $\left \frac{B}{B_0} - 100 \right $
Z_0	Blank

A. EINLEITUNG

1929 berichteten Burr und Burr erstmals, daß es bei fettfrei ernährten Ratten zu Mangelercheinungen kommt, welche durch Fütterung von Linol- bzw. Arachidonsäure reversibel waren (97).

Obwohl bereits 1932 Kurzrok(53,59) die Wirkung von Prostaglandinen beschrieb, und Euler(22,23) 1935 Prostaglandine als Fettsäure-artig charakterisierte, vergingen 30 Jahre bis Bergström und Sjovall(11) die zwei hauptsächlichen Prostaglandine E und F 1957 in kristalliner Form isolierten. Bergström, Samuelsson(10) und van Dorp(110) gelang 1962 die Aufklärung der chemischen Struktur.

Die einzelnen PG unterscheiden sich durch die Anordnung ihrer Doppelbindungen sowie der Hydroxyl- bzw. Ketogruppen(31,38,54,55,77,103). Man teilt sie in vier Hauptgruppen A, B, E und F ein. Es gibt sechs E und F Verbindungen, sogenannte primäre PG, wobei sich je zwei von der $\Delta^{8,11,14}$ -Eikosatriensäure (Dihomo- γ -Linolensäure, aus Linolsäure): PGE_1 und $\text{PGF}_{1\alpha}$ (1er-Serie mit einer Doppelbindung), von der $\Delta^{5,8,11,14}$ -Eikosa-tetraensäure (Arachidonsäure, aus Linolsäure): PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ und von der $\Delta^{5,8,11,14,17}$ -Eikosapentaensäure (aus Linolensäure): PGE_3 und $\text{PGF}_{3\alpha}$ herleiten (Abb.2). Prostaglandine des E-Typs unterscheiden sich von denen des F-Typs durch eine Keto- anstelle einer Hydroxylgruppe am neunten Kohlenstoffatom (Abb.3).

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit $\omega 6$ -(Linolsäure-Gruppe) und $\omega 3$ -Doppelbindungen(Linolensäure-Gruppe) können im Säugetierorganismus nicht gebildet werden und müssen mit der Nahrung zugeführt werden(Abb.2), insbesondere Linolsäure und Arachidonsäure sind essentiell(105,106). Weitere Doppelbindungen können nur zwischen den schon vorhandenen und der Carboxy-Gruppe eingeführt werden.Kettenverlängerungen sind nur am Carboxy-Ende möglich(Abb.2). Damit bleibt der Abstand der ersten Doppelbindung zum Methyl-Ende der Fettsäure stets gleich (ω).

Essentielle Fettsäuren haben wenigstens zwei Funktionen. Sie sind als Strukturlipide für die Bildung und Funktion von Membranen erforderlich, und aus ihnen werden PG und verwandte Verbindungen gebildet(40,105).

Zur Biosynthese der Prostanoid(1,5,70) werden essentielle Fettsäuren(meist Arachidonsäure) aus den Membranphospholipiden enzymatisch durch Phospholipase A_2 oder C freigesetzt(Abb.3). Zwei Enzymsysteme konkurrieren um die so entstandene freie essentielle Fettsäure: durch die Lipooxygenase werden über labile Hydroperoxide Leukotriene oder Hydroxyfettsäuren gebildet, durch die Cyclooxygenase entstehen über die labilen Endoperoxide PGG_2 und PGH_2 Prostaglandine(E_2 , $GF_{2\alpha}$, GD_2), Prostacyclin(68) und Thromboxan(Abb.3)(10,36,39).

PG sind biologisch hochaktiv,d.h. in pikomolaren Mengen wirksam, werden jedoch sehr rasch,vor allem in der Lunge zu einer Vielzahl von Folgeprodukten abgebaut.

Der Organismus bildet täglich nur 20-40 Mikrogramm PGE und PGF(53,97). PG wirken wahrscheinlich vor allem lokal, meist durch Bindung an Rezeptoren(113).

PG sind an vielen physiologischen Prozessen beteiligt wie Tab.5 zeigt. PGE₂ und PGF_{2α} wirken antagonistisch, ebenso Prostacyclin und Thromboxan.

PG spielen für die Nierenfunktion eine große Rolle(63, 70). PGE₂ hemmt die Rückresorption von Natrium am distalen Tubulus und wirkt so natriuretisch(60). Ebenso erhöht es den renalen Blutfluß. Ferner begrenzt es die ADH-Wirkung(19,113). Eine Hemmung der PG entsteht bei erhöhtem Sympathikotonus oder nach Renin-Angiotensin-Aktivierung und führt zu einem Abfall der Nierendurchblutung und -funktion. Die PG-Synthese ist gesteigert bei Bartter-Syndrom, renovaskulärem Hochdruck und Nierenversagen. Die Biosynthese der PG kann somit durch Erkrankungen der Niere ebenfalls verändert werden(45).

Fettsäuren der Linolensäuregruppe sollen der Atherosklerose entgegenwirken, da sie u.a. die Bildung des Thromboxans A₂ vermindern, welches eine Aggregation der Thrombozyten auslöst. Gleichzeitig vermindern sie die Prostaglandinbildung beim Menschen und beeinflussen dadurch auch PG-abhängige Körperfunktionen(16,20,21,114).

Das Ziel dieser Arbeit war es, beim Menschen den Einfluß von unterschiedlichen Mengen an Linolensäure in der Nahrung auf die PG-Bildung der Niere bei gleichbleibender Linolsäurezufuhr zu untersuchen(2,90,93).

B. METHODIK

1. Radioimmunologische Bestimmung der Prostaglandine E_2 und $F_{2\alpha}$ im Urin (8,14,33,51,52,62).

1.1 Prinzip der Meßmethode

Beim Radioimmunoassay handelt es sich um eine Verdrängungsanalyse mit drei Komponenten. Radioaktiv markiertes Antigen (Ligand) und Antigen (gesuchte Substratkonzentration bzw. Inhibitor) konkurrieren um die Bindungsstellen des spezifischen Antikörpers (Binder). Als Ergebnis dieser Kompetition nimmt die Radioaktivität des Ag-Ak-Komplexes in gleicher Weise ab, wie die Konzentration der nachzuweisenden Prostaglandine zunimmt. Gemessen wird nach der Trennung des freien und gebundenen Tracers mit einer Kohle-Dextran-Suspension die Aktivität des Überstandes aus $PG^* \xrightarrow{PG} Ak$ -Komplex. Der freie Ligand wird an die Kohle-Dextran-Suspension gebunden (28).

1.2 Verwendete Reagenzien

(5,6,8,11,12,14,15 (n) $-^3H$) Prostaglandin E_2 (spezifische Aktivität 160 Ci/mmol, 50 μCi /500 μl Ethanol 70 %, Batch 32) wurde von Amersham England gekauft, ebenso (5,6,8,9,11,12,14,15 (n) $-^3H$) Prostaglandin $F_{2\alpha}$ (spezifische Aktivität 180 Ci/mmol, 50 μCi /250 μl Ethanol 70 %, Batch 23). Beide markierten Standards wurden zuerst in Ethanol 70 % und dann in Phosphatpuffer (Gelphos, siehe unten) bis auf 4 nCi/100 μl für den Testansatz verdünnt.

Die Prüfung der Reinheit des Tracers und Inhibitors erfolgte dünnenschichtchromatographisch auf Kieselgelplatten und anschließender Detektion mit dem Dünnschichtscanner oder Anfärbung der nicht markierten Substanzen. Bei nur sehr geringen Radioaktivitätsmengen reichte die Empfindlichkeit des Detektors im Dünnschichtscanner nicht aus, um die niederenergetische Strahlung von Tritium zu erfassen. In diesem Falle wurde daher das auf der Platte befindliche Kieselgel abgekratzt. Anschließend wurden die radioaktiv markierten Substanzen mit Hilfe von Methanol von den Kieselgelresten extrahiert. Nach Abdampfen konnte nun die Radioaktivität in einem Betazähler bestimmt werden. (87).

Lyophilisiertes Kaninchen-Antiserum vom Pasteur-Institut Paris (PGE_2 - BSA: code 79585, $\text{PGF}_{2\alpha}$ - BSA: code 79570) wurde in 22 ml (PGE_2) bzw. in 8 ml (Messung des Formeldiätversuchs mit abgestufter Linolsäurezufuhr) oder 4 ml (Messung des in dieser Arbeit beschriebenen Formeldiätversuchs mit abgestufter Linolensäurezufuhr) Gelphos bei $\text{PGF}_{2\alpha}$ aufgenommen.

Im Gegensatz zu größeren Polypeptiden mit einem Molekulargewicht von ca. 1000 Dalton sind Prostaglandine als Fettsäuren mit niedrigem Molekulargewicht (ca. 350 Dalton) ohne wesentliche antigene Eigenschaften. Durch Konjugierung als Hapten an größere Eiweißkörper kann jedoch Immunogenität erreicht werden, z.B. durch Kopplung der Carboxylgruppe an Thyreoglobulin. Die PG-Thyreoglobulin-Konjugate werden mit Freud'schem Adjuvans durchgemischt

und dann intrakutan Kaninchen injiziert. Brauchbare Antikörper sind etwa nach der fünften Immunisierung zu erwarten (87,109).

Prostaglandin E_2 - und $F_{2\alpha}$ - Standard ("Inhibitor") lieferte Sigma Chemicals Co.St.Louis mit einer Originallösung von 5 mg PGE_2 / 4 ml Gelphos bzw. 5 mg $PGF_{2\alpha}$ / 2 ml Ethanol / Wasser 7 : 3 v/v.

Dem Phosphosalin Puffer PBS von Calbiochem La Jolla, Kalifornien (0,01 M, pH7.4, 0,9 % NaCl, 0,1 % NaN_3 , Lot No. 925067) wurde 0,1 % Gelatine (Apotheke der klinischen Universitätsanstalten München, M 4070) zugefügt und 30 Minuten bei 40° C gerührt bis die Gelatine sich sicher gelöst hatte ("Gelphos") (69).

Die Kohle-Dextran-Suspension enthielt in 100 ml Phosphosalin Puffer 0,250 g Norit A (Serva Feinbiochemica Heidelberg, Best.Nr. 30890) und 0,025 g Dextran T 70 (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala Lot No.8027). Nach dem Mischen stand sie 24 Stunden vor Gebrauch bei 4° C (69,102,111).

Der Tracer und der Standard wurden bei - 20° C, der Antikörper und die übrigen Substanzen wie Puffer und Kohle-Dextran-Suspension bei 4° C aufbewahrt.

1.3 Erstellen der Standardkurve

Die Standardkurve wurde nach dem in Tab.15 angegebenen Schema erstellt. Röhrchen 1 enthielt die gesamte Aktivität des verwendeten Tracers (4 nCi entsprechend ca. 3500 cpm; durch Verdünnung mit 200 μ l Gelphos 3000 cpm), Reagenzglas 3 und 4 beinhaltenen

den Leerwert der Eichlösung (Doppelbestimmung)(28). Das Verhältnis beider Parameter ergab eine Kontrolle für den Testansatz, das binding (% Bo), welches bei dem PGE₂ - RIA 43 % und bei dem PGF_{2α} - RIA 34 % betrug (Abb.1,4,5).

Die Standardverdünnungsreihe (Reagenzglas 5-10) wurde erstellt durch Verdünnung der Prostaglandin-Originallösung (1.2) mit Phosphatpuffer bis auf 100 ng PG/10 ml Gelphos, entsprechend 1000 pg / 100 µl und nochmalige schrittweise Verdünnung im Verhältnis 1:2 bis auf 4 pg (102,111).

Um im RIA interferierende, die Antigen-Antikörper-Reaktion störende unspezifische Faktoren feststellen zu können, wurde als "blank" Puffer mitgemessen, da biologische Proben nicht Prostaglandin - frei zu machen sind ohne chemische Veränderung (Reagenzglas 2). Da viele im RIA interferierende Substanzen, die in biologischen Proben vorkommen können, möglicherweise während des Extraktionsvorgangs auch noch konzentriert werden, wäre es vorteilhaft, wenn Urin, der bekanntermaßen keine Prostaglandine enthielte, mitanalysiert werden könnte. Ein solcher "biologischer blank" existiert jedoch nicht (87). Wasser konnte nicht als blank herangezogen werden, da die Wiederfindungsrate der radioaktiv markierten Prostaglandine hier extrem niedrig war (C.Ergebnisse).

Es empfahl sich von Zeit zu Zeit eine binding-Kurve aufzustellen. Dabei wird eine Verdünnungsreihe des

Antikörpers mit Puffer hergestellt, mit diesen Konzentrationen Leerwerte und gleichzeitig Gesamtaktivität und blank gemessen und daraus % B₀ berechnet als Quotient Leerwert minus blank geteilt durch Gesamtaktivität minus blank mal 100 % (Abb.1).

Das immunoreaktive Material zeigt die Wirkung der Prostaglandin-Synthetase-Aktivität während des Versuchsablaufs (29). Die Bindungsverhältnisse ändern sich erfahrungsgemäß im Laufe der Zeit unabhängig von der Antikörpercharge besonders bei PGF₂α rasch, was die Notwendigkeit zur raschen Versuchsdurchführung unterstreicht. Hatte man linksverlagerte Standardkurven erhalten (niedriges binding), so mußte man den Antikörper weniger stark verdünnen und umgekehrt (Abb.4,5).

Bei erforderlichen Neuansätzen der Standardverdünnungsreihe aus der Originallösung ließ sich die Menge des für die Standardkurve benötigten Inhibitors nicht konstant einstellen, vielmehr traten Schwankungen der Zählraten ein. Diese waren zwar geringfügig, erlangten aber bei der Feinheit der Meßmethode des RIA dennoch Bedeutung. Ferner zeigte sich als wichtige Tatsache, daß die Zählraten der mehrfach im RIA gemessenen Probenansätze bei unterschiedlichen Standardkurvenlagen so gut wie identisch waren, d.h., daß sie bei Bezug auf eine "Normstandardkurve" gleiche Meßwerte lieferten. Das vor Anwendung dieser Methodik wesentliche probeweise Erstellen

einer Standardkurve nach Bereitung eines neuen Inhibitorpools (Vorrat an Material zur Herstellung der Standardkurve) und auch nach Fertigung der Standardverdünnungsreihe (Reagenzglas 5-10) beschränkte sich von da an auf experimentelle Zwecke. Bei den Testansätzen wurde jedoch immer eine Standardkurve mitgeführt, um ein Bild der Bindungsverhältnisse und Güte des Assays zu besitzen (C. Ergebnisse).

1.4 RIA

Die Probentrockne nach der Säulenchromatographie wurde mit 300 μ l Gelphos aufgenommen. Die Variation von Mehrfachbestimmungen in einem Testansatz war mit einem mittleren Variationskoeffizienten von 2 % klein, dagegen ergab sich bei verschiedenen Testansätzen zwischen den Meßwerten für eine Probe eine größere mittlere Schwankungsbreite (6 %). Daher wurden die Proben im Testansatz einfach angesetzt. Sie wurden dann aber bei einem erneuten Assay nach einer Woche nochmals gemessen, um einen Vergleich der Genauigkeit zwischen einzelnen Testansätzen zu haben und die Verlässlichkeit durch Mehrfachbestimmung zu erhöhen.

In ein 10 ml Plastikröhrchen wurden nacheinander 100 μ l Tracer, 100 μ l Probenlösung(bzw. Standard oder Puffer) und 100 μ l Antiserum pipettiert, gemischt und 13 Minuten bei Raumtemperatur equilibriert. Es folgte eine Inkubation in einem Eiswasserbad bei 0° C über ca. 17 Stunden. Am nächsten Tag wurde 1 ml Kohle-Dextran-Suspension rasch zugegeben, bis zur 13. Minute im Eiswasserbad

inkubiert und dann bei 2500 U/min. und 0° C 10 Minuten lang zentrifugiert.

Die Kohle-Dextran-Suspension mußte in einem Eiswasserbad wenigstens 15 Minuten vor und während des Versuchs gemischt werden. Die Gelatine hinderte die Tierkohle daran, markiertes Antigen vom Antikörper abzustreifen. Das Röhrchen 1 mit der totalen Aktivität wurde weder inkubiert noch zentrifugiert. Der abzentrifugierte Überstand wurde in Szintillationsgefäße dekantiert (17,18,98).

1.5 Flüssigkeitsszintillationszählung

Den Proben wurden zur β -Zählung 10 ml eines Szintillators (szinti-gel^R von Carl Roth KG, Karlsruhe) zugefügt. Tritium ist ein schwacher β -Strahler mit einer kinetischen Energie von 18,6 meV. Der Szintillator auf Xylol-Basis mit PPO und POPOP als szintillierende Substanzen ist für wasserhaltige Proben geeignet. Die entstandene Sekundärstrahlung wurde in einem Packard Tri-Carb Flüssigkeitsszintillationszähler (Modell 3390, Packard Instruments, Downers Grove, Illinois USA) gemessen.

Die Zählrate wurde mit zwei Methoden bestimmt. Einmal wurde die Aktivität (cpm) eines externen Prüfstandards mit 10^6 dpm und gegebenem Markierungsalter im β -Zähler gemessen und nach Berechnung des Anteils der noch nicht zerfallenen Kerne ($\frac{N}{N_0}$) nach der

Formel Zählausbeute ist gleich cpm geteilt durch dpm (in Prozent) die Ausbeute zu 48 % bestimmt. Zum anderen ergab die Messung einer hergestellten Tracerverdünnung von 4 nCi ca. 4000 cpm im β -Zähler. Nachdem 1 nCi dpm gleich 2220 Impulsen ist (1 Curie Radium hat $3,7 \cdot 10^{10}$ Zerfälle pro Sekunde) ergibt sich aus diesem Rückschluß nach obiger Formel eine Zählausbeute von 45 %, was mit obiger Bestimmung recht gut übereinstimmt.

Die über 5-10 Minuten gemessene Zählrate wurde von einem angeschlossenen Schreiber als Zählrate pro Minute (cpm) ausgedruckt, gleichzeitig mit der Standardabweichung der gemessenen Zählungen. Die Auswertung erfolgte anhand des Zählprotokolls und des Lochstreifens.

1.6 Berechnung des Prostaglandin-Gehaltes von Urin

a) Nach der Angabe $Z \% = \left| \frac{(Z - Z_0) \cdot 100}{(\overline{LW - Z_0})_{1/2}} - 100 \right| \left(\cong \% \frac{B}{B_0} - 100 \right)$

(69) wurden die für die einzelnen Standardkonzentrationen gefundenen Zählraten (Z) als Prozent des Probenleerwertes (LW) (jeweils nach Abzug des blanks (Z_0)) auf der Ordinate als Z % gegen die Konzentration der Prostaglandine auf der Abszisse halblogarithmisch auf lin-log-Papier aufgetragen (Abb.4 und 5). Die so erstellte Standardkurve erlaubte das Ablesen von Konzentrationen (pikogramm) unbekannter Proben anhand der im RIA gefundenen Zählraten (Z %). Die beiden

Werte aus der Doppelbestimmung wurden gemittelt.

Bei der Ermittlung der PGE_2 -Werte im Urin wurde eine Standardkurve aus dem Formeldiätversuch, der den Einfluß von Linolsäure auf die renale Prostaglandinbildung untersuchte (34), allen aus verschiedenen Testansätzen stammenden Zählraten - auch dieser Arbeit - zugrundegelegt. Sie ist in Abb. 4 als Kurve 2 dargestellt.

Diese bereits erwähnte sogenannte Normstandardkurve stammte aus der Mittelung von mehreren Standardkurven verschiedener Testansätze. Sie war insofern geeignet, als sie eine Meßbreite von $4-96\% \frac{B}{B_0}$ (2 %) mit günstigem Ablesebereich und damit einer hohen Sensitivität aufwies. Ferner ist mit dieser großen Meßbreite aus mathematischen Gründen zwangsläufig die gewünschte Mittellage der Kurve verbunden, um keine falsch zu niedrigen bzw. zu hohen Werte zu bekommen.

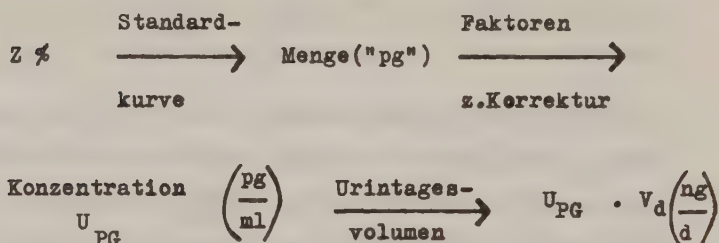
Die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Mengen im Urin ("pg") wurden durch eine Standardkurve, die aus der Mittelung der parallel zum Testansatz erstellten Standardkurven des hier beschriebenen Formeldiätversuchs hervorging ermittelt. Abb. 5 zeigt diese zur Auswertung herangezogene mittlere Standardkurve als Kurve 2. Es wurde also hier bei $\text{PGF}_{2\alpha}$ keine Normstandardkurve verwendet wie in dem Ernährungsversuch, der den Einfluß einer abgestuften Linolsäure -

zufuhr untersuchte (34) bei der Berechnung der PGE_2 - und $\text{PGF}_{2\alpha}$ - Werte im Urin. Denn der Antikörper wurde ja in diesem Versuch bei $\text{PGF}_{2\alpha}$ mit 8 ml Gelphos aufgenommen, bei dem vorhergehenden Formeldiätversuch nur mit 4 ml, sodaß eine Verfälschung bei Anwendung einer Normstandardkurve für alle $\text{PGF}_{2\alpha}$ - Zählraten aus beiden Formeldiätversuchen (Linolsäureeinfluß und Linolensäureeinfluß) zustande gekommen wäre (2,3,4,34).

- b) Jeder Urinprobe wurden entweder 1000 cpm $^3\text{HPGE}_2$ oder $^3\text{HPGF}_{2\alpha}$ zugegeben (102), d.h., daß bei der Hälfte der gemessenen Werte von PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ eine Bestimmung der Ausbeute erfolgte zur Korrektur entsprechend dieser Wiederfindungsraten. Nach Aufnahme der Probentrockne in 300 μl Gelphos (1.4) wurden 50 μl davon in einem Szintillationsglas gemessen. Der gefundene Wert wurde entsprechend dem Probenvolumen (300 μl : 50 μl) korrigiert und aus dem Quotienten (eingesetzte Menge : wiedergefundene Menge ^3HPG) die Ausbeute berechnet. Bei der Probenhälfte ohne Wiederfindungsrate wurden zwei hypothetische Ausbeuten zur Korrektur herangezogen, und zwar einmal der Mittelwert der Wiederfindungsraten einer Chromatographieserie (= eines Tages) und zum anderen der Mittelwert aller Serien, der für PGE_2 bei 29 % und für $\text{PGF}_{2\alpha}$ bei 39 % lag (69)(C.Ergebnisse). Des weiteren wurde mit 0,5 (2 ml Urin extrahiert) und mit 3 (100 von 300 μl im RIA eingesetzt) multipliziert, um die Urinkonzentration in pikogramm PG pro ml Urin (pg/ml) zu erhalten.

- c) Die gefundene Prostaglandin-Konzentration pro ml Urin wurde mit der Tagesurinmenge (in ml) multipliziert und so die Prostaglandinausscheidung in Nanogramm pro Tag berechnet.

Zusammengefaßt folgte die Auswertung dem Schema:



1.7 Extraktion von Urin und Säulenchromatographie der Prostaglandine (34,58,80,84,85,87-89)

Im Urin befinden sich die Urinmetaboliten der im Körper gebildeten Prostaglandine. Die von der Niere stammenden PG werden zum Teil unverändert ausgeschieden (77). Die Menge dieser nativen Prostaglandine ist im Vergleich zu den PG-Abbauprodukten gering. Im RIA können einige der Metaboliten aber die Bestimmungen stören, indem sie ebenfalls mit dem Antikörper reagieren, wie auch unspezifische Kreuzreaktionen mit im Urin vorhandenen Substanzen bekannt sind.

Um die Menge renal ausgeschiedener Prostaglandine radioimmunologisch bestimmen zu können, ist es deshalb notwendig, sie von anderen, gleichfalls im Urin

enthaltenen Substanzen zu isolieren und darüber hinaus die einzelnen Prostaglandine voneinander zu trennen (8,51,52).

Das Verfahren zur Extraktion basiert auf den unterschiedlichen Eigenschaften lipophiler und hydrophiler Lösungsmittel. Prostaglandine als Lipide lassen sich aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften von anderen im Urin enthaltenen Substanzen weitgehend isolieren. Ebenso ist es möglich, den unterschiedlichen Gehalt an OH-Gruppen, durch den sich die Prostaglandine voneinander unterscheiden zu ihrer chromatographischen Trennung auszunutzen.

Frischer Urin wurde am Ende der jeweiligen Sammelperiode spätestens nach 24 Stunden bei -18°C eingefroren. Zur Analyse wurde der gefrorene Urin bei Zimmertemperatur im Wasserbad aufgetaut, kurz aufgeschüttelt, etwa 10 ml in Reagenzgläser abgefüllt und bei 4°C für 10 Minuten bei 2500 U/min. zentrifugiert. 2 ml Urin wurden nach Zugabe von ca. 1000 cpm $^3\text{HPGE}_2$ oder $^3\text{HPGF}_{2\alpha}$ für die Wiedergewinnungskontrolle für jede Probe extrahiert. Als Reagenzien zur Extraktion wurden Ethylacetat, Isopropanol (beides Fa. Merck Darmstadt), 0,1-N-HCL-Lösung und 0,9 % Kochsalzlösung verwendet (34).

Wie bereits erwähnt, machen eine mögliche Kreuzreaktivität und Interferenzen mit unbekannten immunoreaktiven Verbindungen eine Trennung der Prostaglandine von anderen Urinbestandteilen anschließend an die Extraktion auf

einer Kieselsäuresäule nach dem Prinzip der Adsorptionschromatographie notwendig. Das Kieselgel (von der Fa.Sigma Chemicals Co.St.Louis) dient dabei als stationäre Phase, die Prostaglandine werden im Flüssigkeitsstrom der Lösungsmittelgemische unterschiedlich stark retiniert.

Die Trennung erfolgte mit Stufengradientenelution durch drei Lösungsmittel unterschiedlicher Polarität. Als Solventien wurden Benzol, Ethylacetat und Methanol in Gemischen unterschiedlicher Volumenverhältnisse verwendet (Tab.4). Die Nomenklatur richtet sich nach Orczyk und Behrman (80). Solventium 1 ohne Methanol trennt die Prostaglandine A und B ab, das Lösungsmittelgemisch S-4 Prostaglandin E und das polarste Gemisch S-2 mit 20 Volumenanteilen Methanol fraktioniert die Prostaglandine F mit zwei OH-Gruppen am Ring (Tab.4)(34,58,80,84,85, 87-89).

2. Zusammensetzung der Formeldiäten (Tab.1 und 3)

Wenn man die Hemmung der Prostaglandinbiosynthese aus Arachidonsäure durch Linolensäure und ihre Folgeprodukte bestimmen will, darf die Kost keine Arachidonsäure oder Eicosapentaensäure enthalten. Da aber in unserer Nahrung immer Arachidonsäure enthalten ist, mußten für die Untersuchungen Formeldiäten verwendet werden (Tab.1 und 3).

Der Ernährungsversuch wurde mit isocenergetischen FD durchgeführt, um standardisierte Bedingungen zu gewähr-

leisten. Die isoenergetischen Formeldiäten hatten einen Proteinanteil von 15 %, einen Fettanteil von 30 % und einen Kohlenhydratanteil von 55 % der Nahrungsenergie (Tab.3). Das ist eine Verteilung, die den Empfehlungen für eine ausgewogene Kost entspricht. Als Nährstoffquelle für das Eiweiß dienten Hyperprotidine mit einem Proteingehalt von 92 %. Kohlenhydrate lieferten Maltodextrine und ein Pudding welcher als Geschmackskorrigentien Vanille, Karamel, Mandeln, Erdbeeren und Mokka-Sahne enthalten durfte. Der Fettanteil, eine Mischung aus Distel-, Oliven- und Leinöl wurde für die drei Formeldiäten variiert (Tab.1), sodaß bei gleichbleibendem gesamten Fettanteil (30 Energie %) und gleichbleibender Linolensäurezufuhr von 4 Energie % die Linolensäurezufuhr abgestuft 0 %, 4 % bzw. 8 % der Nahrungsenergie bei FD I, II und III ausmachte (Tab.1).

Tab.6 zeigt den Gehalt verschiedener Öle bzw. Fette an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Linol-, Linolen-, Arachidonsäure) (74).

Der Nährstoffgehalt der drei Nahrungsbestandteile in Gramm wurde so berechnet, daß man unter Beachtung des kalorischen Äquivalents und obiger Verteilung der Nahrungsenergie 1000 koal als Summe erhielt (Tab.3). Zusammen mit 2 g Kochsalz, 2 g Kaliumchlorid und 0,3 g Cholesterin wurden die bereits genannten Zutaten einem Liter Wasser beigelegt.

Die Zufuhr von 5 g Kochsalz pro Tag war geringer als die mittlere übliche Zufuhr, welche bei etwa 12 g/d liegt.

Zur Deckung des Vitaminbedarfs diente täglich eine Kapsel Protovita^R (Fa.Roche Grenzach-Whylen).

3. Versuchsablauf

8 Tage vor Versuchsbeginn führten die Versuchspersonen ein Ernährungsprotokoll, aus dem der tägliche Energiebedarf und die tägliche Linolsäurezufuhr berechnet wurden. Bereits zu dieser Zeit begannen sie den 24-Stunden Urin zu sammeln. Der Ernährungsversuch selbst dauerte sechs Wochen. Während der sieben Wochen wurde täglich die Wasserbilanz, die Energiezufuhr und das Körpergewicht bestimmt. Am Morgen jeden Tages wurde die Menge des gesammelten 24-Stunden Urins bestimmt und 100 ml für die spätere Analyse der Prostaglandine bei - 18° C gelagert.

Die Adhaerenz zur Formeldiät wurde durch Bestimmung der Harnsäureausscheidung überprüft (3). Kontrazeptiva oder andere Medikamente durften nicht eingenommen werden.

Der Versuchsablauf dauerte sechs Wochen vom 22. April bis zum 2. Juni 1981. Je zwei Wochen wurde jeweils zwei von den sechs Versuchspersonen (A-F) gemeinsam eine Formeldiät verabreicht. Die drei Formeldiäten

wurden den drei Versuchspaaren in unterschiedlicher Reihenfolge gegeben (Tab.2).

Versuchsperson C bildete eine Ausnahme. Sie setzte in der dritten Woche verspätet mit der gleichen Diät wie Proband D ein und erhielt dann die FD I zuletzt. Die Reihenfolge der Diäten bei Versuchsperson C war damit die gleiche wie bei dem Paar E und F (Tab.2).

Wesentlich in der Abfolge der Diäten ist, daß FD I ohne Linolensäure abgesehen von Versuchsperson D immer auf FD III mit der hohen Linolensäurezufuhr folgte. Bei dem Versuchspaar A und B folgte die hohe Linolensäurezufuhr der FD III gleich zu Beginn des Versuchsablaufs auf die konventionelle Kost.

4. Versuchspersonen

Sechs normalgewichtige, klinisch und laborchemisch gesunde Frauen im Alter zwischen 20 und 30 Jahren nahmen am Versuch teil. Sie wurden eingehend über den Versuchsablauf und die Problemstellung informiert. Sie führten ihr gewohntes Leben weiter, kamen aber jeden Morgen auf die Ernährungsstation, wo sie ihre Formeldiäten erhielten.

C. ERGEBNISSE

1. Überprüfung des Radioimmunoassays

Radioimmunologische Meßmethoden zeichnen sich durch ihre Empfindlichkeit aus. Es gelingt damit pikomolare Konzentrationen zu messen. Untersuchungen im biologischen Material, besonders im Urin, sind oft schwierig, da die Vielzahl der darin enthaltenen Stoffe die Bindung des Antikörpers an das Antigen stören können oder Kreuzreaktionen des Antikörpers mit anderen Substanzen auftreten können.

Besonders bei Messungen im Urin muß deshalb, neben der Sensitivität, die Spezifität und Validität der radioimmunologischen Meßmethode überprüft werden.

1.1 binding(Bindung)

Das binding($\% B_0$) ist der Quotient aus Probenleerwert abzüglich blank und totaler Aktivität abzüglich blank in Prozent(69). Es erlaubt den steilen Teil der Standardkurve in den voraussichtlichen Meßbereich zu legen und hierdurch die gewünschte Sensitivität des Radioimmunoassays zu erreichen. In Verdünnungsreihen des Antikörpers mit Gelphos, um die prozentuale Bindung des Antikörpers an das Antigen zu messen, zeigte sich (Abb.1), daß der für die Messung verwendete Bereich von 30 - 50 % Bindung des Ak an das Ag bei einer Verdünnung des vom

Pasteur-Institut gelieferten gefriergetrockneten Antikörpers in 15-30 ml Gelphos bei PGE_2 bzw. in 3-10 ml Gelphos bei $\text{PGF}_{2\alpha}$ zu erreichen war. Bei Aufstellung von Standardkurven mit verschiedenen Antikörperverdünnungen zeigte sich, daß sich eine Kurve mit großer Steilheit im gewünschten Ablesebereich und damit hoher Sensitivität im Meßbereich bei einem binding von ca. 40-45 % bei PGE_2 bzw. ca. 35 % bei $\text{PGF}_{2\alpha}$ ergab. Diese Bindung entsprach der damit ermittelten Verdünnung des Ak in ca. 20 ml Gelphos bei PGE_2 und ca. 8 ml Gelphos bei $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Weiter zeigte sich dabei, daß ein höheres binding eine größere Meßgenauigkeit bei höherer Antigenkonzentration im Testansatz ergab, bei niedrigem binding dagegen lag die größte Meßgenauigkeit bei niedrigeren Werten (Abb.4 und 5). Hatte man eine zu weit linksverlagerte also im niedrigen pikogramm-Bereich liegende Standardkurve erhalten, so mußte man den Antikörper weniger stark verdünnen und umgekehrt.

Eine Änderung der Bindung führt notwendigerweise auch zur Veränderung der gemessenen Prostaglandinkonzentration in der Probe. Es wurde eine Standardkurve gewählt, welche eine 50 %-ige Verdrängung des markierten Antigens (% B/ Bo) bei ca. 50 pg hatte (Kurve 2 aus Abb.4 und 5) (1.6a). Durch ein höheres binding ergaben sich größere Werte, während ein niedrigeres binding kleinere Werte in der Probe ergab, wie aus der Literatur bekannt ist (56,69,102).

1.2 Sensitivität

Die Sensitivität ist definiert als die kleinste Menge nicht markierter Substanz, die reproduzierbar im RIA nachgewiesen werden kann (87). Bei der Standardkurve (Abb.4 und 5) lag die theoretische untere Nachweisgrenze bei etwa 4 pg oder 15 f Mol. Die Verdrängung der gebundenen Radioaktivität ($\% B/B_0$) in Gegenwart von 10 pg PG war immer von der beim Leerwert gemessenen Verdrängung verschieden. Auch Pufferlösungen, die als blank dienten, ergaben ablesbare Werte im Bereich von ca. 4-5 pg (siehe 1.4). Damit lag die tatsächliche untere Nachweisgrenze im RIA bei ca. 7-10 pg oder 20-30 f Mol Prostaglandin.

Die Sensitivität wird von einer Reihe von Faktoren bestimmt, zu denen die Affinität des Antigens gehört. Die Affinität beschreibt die Bindungsintensität einer Antigen-Antikörper-Reaktion unter Berücksichtigung der Eigenschaften des Antigens. Sie wird erfaßt durch die Assoziationskonstante, die laut Angaben des Pasteur-Instituts für den PGE_2 -Antikörper bei $8,2 \cdot 10^{10} M^{-1}$ und den $PGF_{2\alpha}$ - Antikörper bei $1,1 \cdot 10^{10} M^{-1}$ lag. Die hohe Sensitivität wird auch durch die hohe spezifische Aktivität der Tritium-Tracer determiniert (160 bzw. 180 Ci/mmol bei 3HPGE_2 bzw. $^3HPGF_{2\alpha}$). Eine 20 %, 50 % und 80 % Änderung der Bindung des Antigens an den Antikörper ($\% B/B_0$, Z %) trat bei PGE_2 bei 15 pg, 50pg und 150pg

auf, bei $\text{PGF}_{2\alpha}$ bei 30 pg, 60 pg und 280 pg. (Abb.4 und 5: Kurve 2). Diese Ergebnisse liegen damit zwischen den Werten von Dray et al. (18) und Tan et al. (102) mit einer ähnlichen Methodik.

1.3 Spezifität

Die Spezifität wird meist aus den Kreuzreaktionen des Antikörpers abgelesen (32,87-89,102,109). Die Kreuzreaktion vieler Metaboliten im Urin kann vernachlässigt werden, da diese Verbindungen erheblich polarer sind als die primären Prostaglandine und damit bei der dem RIA vorangehenden Chromatographie sicher abgetrennt werden.

Bei Messungen von Proben mit einem Gehalt von 333 und 111 pg Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ - Standardsubstanz (Verdrängung des Antigens von 85 bzw. 60 %) mit dem PGE_2 - Antikörper ergab sich eine vermeintliche PGE_2 - Menge von 16 ± 4 bzw. 4 ± 1 pg PGE_2 , d.h. die Kreuzreaktivität des PGE_2 -Antikörpers gegenüber $\text{PGF}_{2\alpha}$ war 5 ± 1 %. Die umgekehrte Messung von Proben mit einem Gehalt an PGE_2 -Standardsubstanz (auch 333 und 111 pg) mit dem $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Antikörper ergab eine vermeintliche $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Menge von 10 ± 3 bzw. 0-4 pg (unter der Nachweisgrenze) $\text{PGF}_{2\alpha}$, also eine Kreuzreaktivität des $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Antikörpers gegenüber PGE_2 von 3 ± 1 %.

Nach den Angaben des Pasteur-Instituts wies der PGE_2 - Antikörper bei einer Verdrängung (% B/Bo) von 50 % eine Kreuzreaktivität von 10,7 % gegenüber PGE_1 , 0,11 % gegenüber $\text{PGF}_{2\alpha}$, 0,01 % gegenüber PGA_2 , PGB_2 , PGD_2

und 15 % gegenüber den 13-14-Dihydro-(2,1 %) und 15-Keto-Metaboliten (13,2 %) von PGE_2 auf. Der $\text{PGF}_{2\alpha}$ - Antikörper hatte laut Angaben des Herstellers (bei % B/Bo = 50 % bestimmt) eine Kreuzreaktivität von 25 % mit $\text{PGF}_{1\alpha}$, 2 % mit PGD_2 , 0,01 % mit PGA_2 , PGB_2 , und PGE_2 und 1,3 % bzw. 1,6 % mit den Dihydrometaboliten von $\text{PGF}_{1\alpha}$ und $\text{PGF}_{2\alpha}$ (17,18,69,98,111).

Unter der Annahme, daß sich radioaktiv markiertes Prostaglandin auf der Kieselgelsäule genauso verhält wie nicht markiertes Prostaglandin wurde die Trennschärfe der Säulenchromatographie bestimmt durch Zugabe von ca. 1000 cpm $^3\text{HPGE}_2$ bzw. $^3\text{HPGF}_{2\alpha}$ zum Urin und nachfolgender Extraktion und Säulenchromatographie. Gemessen wurde der Anteil der wiedergefundenen Radioaktivität (% cpm) verteilt auf die drei getrennten Fraktionen PGA/B , PGE und PGF . Abb.6 zeigt, daß bei Zugabe von 1000 cpm $^3\text{HPGE}_2$ 25 ± 6 % der wiedergefundenen Aktivität sich in der Fraktion A/B, 52 ± 7 % in der Fraktion E und 23 ± 6 % in der Fraktion F befanden. Das eluierte Prostaglandin E befand sich also zur Hälfte in der dazugehörigen Fraktion E (34,58). Bei Messungen der drei getrennten Fraktionen im Radioimmunoassay mit dem PGE_2 -Antikörper (Abb.7) betrug der Anteil der gefundenen Menge an PGE_2 (% pg) in der Fraktion A/B praktisch 0 %, in der Fraktion E 45 ± 7 % und in der Fraktion F 55 ± 7 %. Es fanden sich also 55 % des mit dem PGE_2 -Antikörper reagierenden Materials in der PGF -Fraktion, obwohl dorthin laut obigen Ergebnissen nur 23 % an PGE eluiert wurden. Es zeigte sich, daß der

PGE₂-Antikörper keine Kreuzreaktivität mit PGA und PGB aufwies. Jedoch wurden von den 25 % in der Fraktion A/B eluierten PGE keine im RIA gemessen, was eine hemmende Substanz in dieser Fraktion vermuten läßt. Bei der Erklärung der Diskrepanz zwischen Säulenchromatographie und RIA ist man auf Hypothesen angewiesen. PGE₂ ist eine sehr instabile Verbindung (31). So könnten z.B. polare Dihydro- oder Keto-Metaboliten von PGE₂ in der polare Substanzen enthaltenden Fraktion F ausgewaschen und als PGE₂ vom Antikörper erkannt werden. Während die Kreuzreaktivität gegenüber PGF_{2α} (s.oben) vernachlässigt werden kann, gilt es die mit PGE₁ und PGE₃ zu beachten. Möglich wäre auch, daß in der PGE-Fraktion neben PGE₂ auch PGE₁ und PGE₃ (aus der Linolensäurezufuhr) ausgewaschen werden. Der Anteil dieser Metaboliten würde den prozentualen Anteil des PGE₂ in der PGE-Fraktion vermindern, sodaß bei voller Erfassung der PGE₂ - Menge in der F-Fraktion (23 %), relativ etwa gleichviel PGE₂ in der E- und F-Fraktion gemessen werden.

Abb.8 zeigt die Verteilung der wiedergefundenen Radioaktivität in den drei Fraktionen bei Zugabe von ca. 1000 cpm ³HPGF_{2α} zum Urin. So fanden sich 10 ± 3 % der Aktivität in der Fraktion A/B, 20 ± 7 % in der Fraktion E und 70 ± 13 % in der Fraktion F (34). Die im Vergleich zur Abtrennung von PGE wesentlich bessere Trennschärfe bei PGF spiegelt sich auch im Radioimmunoassay wieder (Abb.9).

Die radioimmunologische Bestimmung zeigte bei Messung des Gehaltes von PGF_{2α} in den drei getrennten Fraktionen

mit dem $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Antikörper ($\% \text{ pg}$) eine Übereinstimmung mit der Verteilung der Säulenchromatographie. Das eluierte PGF befand sich zu 70% in der F-Fraktion und $75 \pm 11 \%$ der insgesamt mit dem $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Antikörper in den drei Fraktionen gemessenen $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Menge befand sich in der F-Fraktion. In der PGA/B-Fraktion wurde mit dem $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Antikörper $5 \pm 2 \%$, in der PGE-Fraktion $20 \pm 11 \%$ $\text{PGF}_{2\alpha}$ gemessen.

Unter Berücksichtigung der fehlenden chemischen Identifizierung sollte in den vorliegenden Versuchen besser immer nur von immunreaktivem Material an PGE_2 oder $\text{PGF}_{2\alpha}$ die Rede sein. Lediglich aus praktischen Gründen wurde auf die ständige Zufügung des Adjektivs "immunreaktiv" verzichtet (87).

1.4 Validität

Die Überprüfung der Validität oder Richtigkeit eines Radioimmunoassays (107) erfolgt am besten durch einen direkten Vergleich der Meßwerte im RIA mit einer anderen zuverlässigen Analyse-methode wie der Gaschromatographie - Massenspektroskopie. Eine derartige Anlage stand nicht zur Verfügung (29,46,87,88).

Die Validität der Säulenchromatographie konnte dagegen im direkten Vergleich mit der Hochdruckflüssigkeitschromatographie untersucht werden. Dabei ergab die Messung von 18 Proben im Urin eine gute Übereinstimmung der Werte von SC-RIA und HPLC-RIA mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,83$ bei PGE_2 und $r = 0,85$ bei $\text{PGF}_{2\alpha}$ (40).

Neben einem Vergleich des RIA mit einem Bioassay (86) ist es bei PGE_2 möglich, die drei radioimmunologischen Methoden zur PGE_2 -Messung (Antikörper gegen PGE_2 , Antikörper gegen PGB_2 nach vorangegangener Konversion von PGE_2 zu PGB_2 und Antikörper gegen $\text{PGF}_{2\alpha}$ nach vorheriger Konversion von PGE_2 zu $\text{PGF}_{2\alpha}$) direkt zu vergleichen, indem man zum Urin bestimmte PGE_2 -Mengen zugibt und diese dann nachzuweisen versucht. Verschiedene Autoren (18,87,88,111) haben dabei gezeigt, daß sich die beste Wiederfindungsrate bei Messung des PGE_2 mit dem PGE_2 -Antikörper ergibt. Von dieser Methode wurde auch in diesem Versuch Verwendung gemacht.

Da wie früher bereits erwähnt, ein PG- freier Urin nicht existiert, wurde im Leerwert Wasser eingesetzt. Im destillierten Wasser, das mit der gleichen Methode mitextrahiert und chromatographiert wurde, wies die radioimmunologische Bestimmung eine Verdrängung der gebundenen Radioaktivität von $3 \pm 0,5 \%$ für PGE_2 und $1 \pm 0,3 \%$ für $\text{PGF}_{2\alpha}$ auf. Diese Werte für den Wasser-Leerwert liegen damit wie gefordert unter der Nachweisgrenze des Radioimmunoassays (18).

Eine andere Bedingung, die von einem PG-RIA erfüllt werden sollte, ist der Nachweis eines Anstiegs und / oder Abfalls unter experimentellen Bedingungen, die zu solchen Veränderungen führen (87).

Am 25. und 26.5.1981 wurde den Versuchspersonen Aspirin^R - ein Cyclooxygenase-Blocker- verabreicht (115). Die Prostaglandinkonzentration in diesen Proben lag unter der Nachweisgrenze.

1.5 Präzision

In einer Versuchsreihe wurden gleiche Proben mehrfach in einem Radioimmunoassay angesetzt. Die Streubreite innerhalb eines Versuchsansatzes betrug bei PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ im Mittel 2 %. In der zweiten Versuchsreihe wurden mehrere gleiche Proben in verschiedenen Testansätzen an aufeinanderfolgenden Tagen gemessen. Dabei betrug der mittlere Variationskoeffizient für PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ 6 % (18,102). Diese Angaben bezogen sich auf den steilen Teil der Standardkurve zwischen 20 und 80 % Verdrängung durch das Antigen, in dem die Bestimmungen erfolgten. Bei höheren und niedrigeren Antigenkonzentrationen verlief die Standardkurve flach, und die Werte konnten nicht genau abgelesen werden.

1.6 Recovery

Jeder Urinprobe wurden etwa 1000 cpm $^3\text{HPGE}_2$ bzw. $^3\text{HPGF}_{2\alpha}$ zugegeben, um den Verlust über die Probenaufarbeitung abschätzen zu können. Dieses Vorgehen setzt voraus, daß radioaktiv markierte PG sich bei der Analyse genauso verhalten wie die natürlich vorkommenden. Dies ist nach den bisherigen Untersuchungen gewährleistet.

Die Wiederfindungsrate nach der Extraktion und vor der Säulenchromatographie betrug zwischen 80 und 90 %.

Um im Radioimmunoassay eine Mehrfachbestimmung der Proben in den getrennten Fraktionen durchführen zu können, mußten 2 ml Urin extrahiert werden. Bei Extraktion von 1 ml Urin war der Gehalt an Prostaglandin E_2 und $\text{F}_{2\alpha}$ in den jeweiligen Fraktionen zu niedrig, da nach Aufnahme

der Probentrockne mit 300 μ l Gelphos nur 100 μ l davon im Radioimmunoassay eingesetzt wurden.

Die Ausbeute nach der Chromatographie betrug für PGE_2 insgesamt in den drei Fraktionen $55 \pm 11 \%$, in der PGE -Fraktion fanden sich $29 \pm 8 \%$ der anfangs eingesetzten Radioaktivität an $^3\text{HPGE}_2$ (C. 1.3). Für $\text{PGF}_{2\alpha}$ ergab sich eine Wiederfindungsrate insgesamt in den drei Fraktionen von $56 \pm 13 \%$, in der PGF -Fraktion fanden sich $39 \pm 9 \%$ der anfangs eingesetzten Radioaktivität an $^3\text{HPGF}_{2\alpha}$ wieder (18,34,102,111).

Um den Einfluß der Methode der Säulenchromatographie auf den im RIA gefundenen Gehalt an Prostaglandinen im Urin näher zu untersuchen, wurde zwischen der Elution der PG in drei Fraktionen und der Elution aller PG verglichen. PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ wurden dann anschließend in den drei Fraktionen einerseits und in dem Gesamt-eluat andererseits bei der gleichen Urinprobe mit demselben Radioimmunoassay bestimmt.

Dabei zeigte sich eine deutlich größere Konzentration von PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ im Urin nach Trennung der Prostaglandine mit den Lösungsmittelgemischen als nach Elution aller Prostaglandine mit dem Lösungsmittelgemisch S-2 (Tab.4). Nach der säulenchromatographischen Trennung fanden sich in der Probe $77 \pm 18 \%$ PGE_2 gegenüber $23 \pm 13 \%$ PGE_2 nach dem Durchwaschen. Die Messung von $\text{PGF}_{2\alpha}$ zeigte nach Trennung einen Anteil von $66 \pm 14 \%$ im Vergleich zu $34 \pm 14 \%$ nach Durchwaschen. Nach Durchwaschen der Säule mit Lösungsmittel S-2 wird

bei $\text{PGF}_{2\alpha}$ prozentual mehr gefunden als bei PGE_2 . Da die Fraktion F üblicherweise mit dem hier zur Elution aller Prostaglandine verwendeten Lösungsmittelgemisch S-2 abgetrennt wird, könnte eine verminderte Elution von PGE_2 im Vergleich zu $\text{PGF}_{2\alpha}$ nach Durchwaschen dadurch erklärt werden.

1.7 Herstellung der Prostaglandin-Standardverdünnung

Bei der Herstellung der Prostaglandin-Standardverdünnungsreihe von 4 pg bis 1000 pg Prostaglandin E_2 bzw. $\text{F}_{2\alpha}$ aus der Originalstammlösung mit 5 mg $\text{PGE}_2/\text{PGF}_{2\alpha}$ (Methodik 1.3) traten bei den im Laufe der Durchführung der Probenmessungen erforderlichen Neuansätzen Schwankungen in der Verdrängung des Antigens (% B zu Bo) bzw. in den erhaltenen Standardkonzentrationen ein. Diese waren meist zwar geringfügig, erlangten aber bei der Feinheit der Meßmethode dennoch Bedeutung. Diese unterschiedliche Güte der Endverdünnung des Standards zu verschiedenen Zeitpunkten war neben der Genauigkeit der Verdünnung auch auf Einflüsse von Lagerung und unspezifischer Adsorption oder auf die Instabilität des PG-Standards zurückzuführen.

Wesentlich war der Einfluß der Güte der Standardverdünnungsreihe beim Erstellen der Standardkurve, wo unbrauchbare Inhibitoren eine Verdrängung von 0 - 80 % bzw. 20 - 100 % (% B zu Bo) aufwiesen und damit einmal zu hohe und einmal zu niedrige Werte ergaben.

Kurven mit großem Ablesebereich im Bereich der zu messenden Konzentrationen waren die zur Auswertung verwendeten qualitativ guten Kurven 2 aus Abb. 4 und 5 mit einer Verdrängung des Antigens von 5 % bei einer eingestellten Konzentration von 4 pg PGE_2 oder $\text{PGF}_{2\alpha}$, von 50 % bei einer Konzentration zwischen 37 und 111 pg PG und von 95 % bei einer eingestellten Standardkonzentration von 1000 pg PG.

2. Ergebnisse des Formeldiätversuchs

Von jeder der sechs Versuchspersonen wurde an den ersten, dritten, fünften, zehnten, zwölften und vierzehnten Versuchstagen während der 14 -tägigen Formeldiätperiode mit einer Linolensäurezufuhr von 8 Energie % (FD III, Tab.1) die Konzentration von PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ in einem ml Urin (Tab.7 und 8) und daraus durch Multiplikation mit der Tagesurinmenge die gesamte Prostaglandinmenge im 24-h-Urin bestimmt. (Tab.11 und 12). Die Ausscheidung von PGE_2 der sechs gesunden weiblichen Versuchspersonen während der Formeldiätperiode mit einer Linolensäurezufuhr von 8 Energieprozent zeigte keine Änderung im Vergleich zur Linolensäure-freien Formeldiät. Bei $\text{PGF}_{2\alpha}$ dagegen nahm sie während der FD ohne Linolensäure gegenüber der FD mit 8 Energie % Linolensäure zu (Abb. 11 und 12). Die gefundenen Mittelwerte und Standardabweichungen sind in Abb. 13 und 14 dargestellt.

Mit der verwendeten Methode ergaben sich während der Formeldiätperiode III auch keine auffälligen Änderungen der ausgeschiedenen Menge an PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ im 24-h-Urin.

Die tägliche Ausscheidung von PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ war damit unter der Zufuhr von Linolensäure während der zwei Wochen dauernden Versuchsperiode annähernd konstant (Abb. 13 und 14). Die über die gesamte Versuchsperiode berechnete mittlere Ausscheidung war für PGE_2 $410 \pm 56 \text{ ng/d}$ und für $\text{PGF}_{2\alpha}$ $990 \pm 78 \text{ ng/d}$ (Tab. 11 und 12).

Ebenso wurde von jeder der sechs Versuchspersonen an den ersten beiden Versuchstagen einer zwei Wochen dauernden Formeldiätperiode ohne Linolensäurezufuhr (FD I, Tab.1) die Menge an PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ in der Probe (Tab. 9 und 10) und im 24-h-Urin bestimmt (Tab. 13 und 14). Abgesehen von Versuchsperson D folgte die Formeldiät I immer auf die Formeldiät III (Tab.2).

Die durchschnittliche Ausscheidung von PGE_2 im 24-h-Urin der Versuchspersonen an den ersten beiden Tagen der Formeldiätperiode ohne Linolensäurezufuhr (FD I) zeigte keine Änderung gegenüber den unter Formeldiät III gemessenen Werten (Abb.11). Im Durchschnitt wurden während der beiden Tage $370 \pm 57 \text{ ng/d}$ PGE_2 im Vergleich zu $410 \pm 56 \text{ ng/d}$ während der hohen Linolensäurezufuhr gemessen (Abb. 13).

Die tägliche Ausscheidung von $\text{PGF}_{2\alpha}$ im Urin zeigte dagegen am zweiten Tag der Formeldiätperiode ohne Linolensäurezufuhr einen Anstieg gegenüber den während der 14-tägigen Linolensäuregabe von 8 Energieprozent und am ersten Versuchstag ohne Linolensäurezufuhr gemessenen

Werten (Abb.12). Die Ausscheidung von $\text{PGF}_{2\alpha}$ im 24-h-Urin stieg von $990 \pm 78 \text{ ng/d}$ während der Formeldiät III auf $940 \pm 521 \text{ ng/d}$ am ersten Versuchstag der FD I und auf $1334 \pm 512 \text{ ng/d}$ am zweiten Versuchstag (Abb.14; Tab. 14).

Bei Versuchsperson D folgte die Formeldiätperiode I nicht auf FD III wie bei den anderen fünf Probanden, sondern auf die dem Ernährungsversuch vorausgehende freie Kost. Im 24-h-Urin der Versuchsperson D wurden während FD I 852 ng/d PGE_2 und $1780 \pm 94 \text{ ng/d PGF}_{2\alpha}$ gemessen (Tab. 13 und 14). Diese Werte sind deutlich höher als die Ausscheidung unter FD III ($410 \pm 56 \text{ ng/d PGE}_2$, $990 \pm 78 \text{ ng/d PGF}_{2\alpha}$; Tab.11,12) oder wenn FD I nach FD III gegeben wurde ($320 \pm 178 \text{ ng/d PGE}_2$, $1010 \pm 486 \text{ ng/d PGF}_{2\alpha}$; Tab.13 und 14). Bei Versuchsperson D wurde eine 2,1-fach höhere PGE_2 - und eine 1,8-fach höhere $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Menge während FD I im Vergleich zu FD III gemessen (Abb.11 und 12). Die Prostaglandinmenge im 24-h-Urin lag bei Versuchsperson D unter FD I auch höher als bei den anderen fünf Versuchspersonen unter FD I (Abb.11 und 12). Bei Versuchsperson D betrug die Ausscheidung für PGE_2 das 2,7-fache und für $\text{PGF}_{2\alpha}$ das 1,8-fache der bei den übrigen fünf Versuchspersonen gefundenen Ausscheidung während FD I.

Versuchsperson A und B begannen mit Formeldiät III. Bei den anderen vier Versuchspersonen kam die FD III

dagegen erst nach der FD II (Tab.1 und 2). Bei Versuchsperson A und B zeigte sich im 24-h-Urin (Tab.11 und 12) eine 1,4-fach höhere Menge PGE_2 ($634 \pm 320 \text{ ng/d}$ gegenüber $443 \pm 290 \text{ ng/d}$) und $\text{PGF}_{2\alpha}$ ($1198 \pm 346 \text{ ng/d}$ gegenüber $881 \pm 356 \text{ ng/d}$) im Vergleich zu den anderen vier Versuchspersonen (Abb.11 und 12).

D. DISKUSSION

Viele Untersuchungen zeigen, daß die Fettsäurenzusammensetzung der Gewebslipide durch die Zusammensetzung der Fettsäuren in der Nahrung beeinflusst wird (43,65,66,108). Die Verfügbarkeit an Fettsäuren, die Ausgangssubstanzen für die Synthese der Prostaglandine darstellen, kann durch die Art des Nahrungsfettes verändert werden. Die Verfügbarkeit der Ausgangssubstanzen (Di-homo-gamma-Linolensäure und Arachidonsäure aus Linolsäure, Eikosapentaensäure aus α -Linolensäure) ist entscheidend für die PG - Biosynthese (25,47,79,112).

So führt die Zufuhr von Linolsäure in hoher Konzentration zu einem Anstieg der PG-Bildung in verschiedenen Geweben wie bereits einige Autoren zeigten (26,50,67,75,78,81,91). Adam (1-4,116) zeigte, daß die Zufuhr von Linolsäure in isoenergetischen Formel-diäten beim Menschen die Synthese von PGE_2 in der Niere stimuliert.

Die α -Linolensäure ($18:3\omega3$) ist die Vorstufe der Arachidonsäure (Eikosapentaensäure $20:5\omega3$) und kommt vor allem im Leinöl (daher der Name) und im Sojaöl vor (Tab.6). Die gleichen Enzyme wie bei der Linolsäure ($18:2\omega6$) dienen zur Desaturierung und Kettenverlängerung von Linolensäure ($18:3\omega3$) (Abb.2). So wird sie zuerst an der $\Delta6$ -Position desaturiert zur $18:4\omega3$ - Fettsäure, dann kettenverlängert zur $20:4\omega3$ - Fettsäure und weiter entsättigt an der $\Delta5$ - Po-

sition zur Eikosapentaensäure (20:5 ω 3).

Die Eikosapentaensäure wird im Vergleich zur Arachidonsäure von der Cyclooxygenase in wesentlich geringerem Umfang zu PG umgewandelt (16,41,114,115). Die Synthese der 3-er Serie der Prostaglandine und Thromboxane aus Timnodonsäure spielt beim Säugetier keine Rolle. Timnodonsäure (Eikosapentaensäure 20:5 ω 3) findet sich vor allem bei Meerestieren, deren Fleisch und Öl reich an dieser Substanz ist (6,20,21,94,95), z.B. Dorschleberöl und hat physiologisch Bedeutung im zentralen Nervensystem und bei Photorezeptoren.

Die primären PG werden im Körper völlig abgebaut, deshalb gibt die Messung der primären PG im Urin nur über die Prostaglandinbildung der Niere Auskunft (71,83,101). Wie Frölich et al. demonstrierten, erscheint PGE₂ nicht im Urin, wenn es intravenös zugeführt wird, wogegen die Infusion von Arachidonsäure in die Nierenarterie zu einem gleichseitigen Anstieg der PGE₂ - Ausscheidung führt (27). Wie Beckman und Zehr beschrieben, werden während Nierenischämie auch parallele Veränderungen in der Konzentration von PGE₂ im Urin und Nierenvenenblut beobachtet (7). Im renalen System kann deshalb der Einfluß einer bestimmten Diät auf die PG-Bildung aus Arachidonsäure direkt untersucht werden (61).

Bei unserem Versuch sollte die Wirkung einer Zufuhr von Linolensäure auf die Synthese von Prostaglandinen

aus Arachidonsäure untersucht werden.

In diesem Ernährungsversuch wurde deshalb beim Menschen erstmals eine konstante Menge an Linolsäure von 4 Energieprozent zugeführt, während die Linolensäure in den drei Formeldiäten mit einem Anteil von 0 %, 4 % bzw. 8 % der Nahrungsenergie variiert wurde (Tab.1). In FD I sollte damit keine Hemmung, in FD III die größte Hemmung der PG-Bildung durch Linolensäure auftreten.

Es wurden keine Männer für den Ernährungsversuch herangezogen, da bei ihnen eine Beimischung von Prostaglandinen aus den akzessorischen Geschlechtsdrüsen die Prostaglandinausscheidung im Urin erhöht (82). Die Möglichkeit einer Verfälschung der Ergebnisse durch vaginale Sekretion und Produktion in Ureter und Harnblase ist dagegen wahrscheinlich zu vernachlässigen. Frauen als Versuchspersonen zeigen also wesentlich verlässlichere Resultate (15,82).

Zwei Hypothesen aus der Literatur lassen sich für den hemmenden Einfluß der Linolensäure auf die PG-Synthese aus Arachidonsäure anführen.

Einmal kommt es wegen der höheren Affinität der desaturierenden und kettenverlängernden Enzyme zu Linolensäure als zu Linolsäure zumindest in vitro zu einem Absinken der Menge an Arachidonsäure, wenn man ansteigende Konzentrationen von Linolensäure zusätzlich zu Linolsäure einsetzt. Wie Mohrhauer und Holman zeigten (44,65,66), hemmt Linolensäure also die Umwandlung

von Linolsäure in Arachidonsäure.

Trans-Isomere der Linolsäure hemmen ebenfalls die Umwandlung von Linol- in Arachidonsäure (12,92). Hwang und Kinsella (49) demonstrierten in Experimenten an Ratten, daß die Fütterung mit trans-Linolsäure einen deutlichen Abfall der Ausgangssubstanzen der Prostaglandin-Synthese und der entsprechenden PG im Serum verursachte.

Zweitens wirkt die Eikosapentaensäure (20:5 ω 3) nach Angaben verschiedener Autoren wie Hansen und Jensen (41), Whitaker et al. (72,73,114), Culp et al. (16) sowie Gryglewski et al. (35) als Substratanalogon der Arachidonsäure bei der Synthese der hier im Urin bestimmten Verbindungen PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Abb.2).

Arachidonsäure und Eikosapentaensäure konkurrieren dabei infolge ihrer Strukturähnlichkeit um die Besetzung des aktiven Zentrums der membrangebundenen Cyclooxygenase. Bei dieser kompetitiven Hemmung wird jedoch die maximale Geschwindigkeit der Umsetzung von Arachidonsäure in die gemessenen Metaboliten PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ auch in Gegenwart des Hemmstoffs Eikosapentaensäure (aus Linolensäure) bei großer Substratkonzentration an Arachidonsäure erreicht. Die bereits im Körper vorhandene Menge an Arachidonsäure im "endogenen Arachidonsäurepool" (ca.100 g) ist relativ groß und wirkt der Hemmung durch Eikosapentaensäure entgegen (41). Es resultiert jedoch eine geringere Affinität des Enzyms zum Substrat in Gegenwart des Hemmstoffs (13,42,57).

Die während der FD III-Periode im Mittel gemessenen Werte von PGE_2 im Urin ($410 \pm 57 \text{ ng/d}$) stimmen sehr gut mit den von Tan et al. (102) mit demselben Antikörper des Pasteur-Instituts gemessenen Werten überein ($416 \pm 58 \text{ ng/d}$).

Hwang und Carrol (48) zeigten in ihrem Ernährungsexperiment an Ratten, daß bei Steigerung der Zufuhr von Linolensäure der Gehalt von Linolensäure, Eikosapentaensäure und Linolsäure in den Gewebs- und Serumlipiden zunahm, während die Konzentration von Arachidonsäure, PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ und Thromboxan A_2/B_2 abnahm. Der Anstieg von Linolsäure wurde auf den hemmenden Einfluß der Linolensäurezufuhr auf die Umwandlung von Linolsäure in längerkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren zurückgeführt (44,65,66), wodurch dann auch die Arachidonsäure-Konzentration und mit ihr die Konzentration an PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$ und TX im Serum sank.

Adam (2) fand bei der Auswertung des hier beschriebenen Ernährungsexperimentes, daß mit der Zufuhr von Linolensäure eine Verminderung der Ausscheidung von TNPDA (Tetranorprostandisäure, mengenmäßig größtes gemeinsames Derivat der PG-Urinmetaboliten) (37,76) und PGE_2 im Urin einherging, während die tägliche Ausscheidung von $\text{PGF}_{2\alpha}$ konstant blieb.

Die hier vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß die Ausscheidung von PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ während der Formeldiätperiode mit einer Linolensäurezufuhr von 8 Energieprozent (Abb.11 und 12) konstant blieb und sich abgesehen

von $\text{PGF}_{2\alpha}$ im Vergleich zur Linolensäure-freien Formeldiät nicht änderte. Abb. 13 und 14 verdeutlichen, daß sich die tägliche Ausscheidung im Urin und damit die Synthese von PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ in der Niere unter der Zufuhr von synthesehemmender Substanz während zwei Wochen der FD III nicht oder nicht mehr änderte sondern in etwa auf gleicher Ebene bewegte. Die erwartete Verminderung der PG_2 -Bildung im Nierenmark durch Linolensäure trat also während einer zwei Wochen dauernden Zufuhr von 8 Energieprozent nicht oder nicht mehr ein.

Die PGE_2 -Ausscheidung stieg auch nicht an den ersten beiden Tagen der Formeldiätperiode ohne Linolensäuregabe (FD I) gegenüber den unter FD III gemessenen Werten an. Abgesehen von Versuchsperson D folgte die FD I immer auf die FD III (Tab.2). Es ist daher leicht möglich, daß sich die Synthese von PGE_2 im Nierenmark während der nur kurzen Abwesenheit von zwei Tagen der die PG_2 -Bildung vermindernenden Linolensäure nicht oder noch nicht steigern ließ bzw. noch unter dem Einfluß der Linolensäure stand. Die Synthese von $\text{PGF}_{2\alpha}$ zeigte dagegen am zweiten Tag der FD I den erwarteten Anstieg. Es können jedoch keine Aussagen über den weiteren Verlauf der täglichen Ausscheidung von PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ ohne die Zufuhr der die PG_2 -Bildung beim Menschen wahrscheinlich vermindernenden α -Linolensäure gemacht werden.

Drei Erklärungsmöglichkeiten lassen sich dafür anführen, daß die PGE_2 -Ausscheidung während der Formel-diätperiode III gleich blieb und nicht, wie aufgrund der Ergebnisse von Hwang (48) und Mohrhauer (44,65,66) naheliegend, abnahm.

Erstens haben die desaturierenden und kettenverlängernden Enzyme (Abb.2) zwar eine höhere Affinität zur Linolensäure als zur Linolsäure, wodurch es zu einem Abfall der Arachidonsäuremenge kommt. Aber die Linolensäure und ihre Folgeprodukte werden langsamer verstoffwechselt, wie Whitaker et al. und Culp et al. zeigten (16,114), sodaß die Bildung von PG mit drei Doppelbindungen weitgehend unterbleibt. Es entsteht weniger kompetitiver Hemmstoff Timnodonsäure.

Hansen und Jensen (41), die eine Gruppe von Ratten 13 Wochen lang mit 2 Energie % Ethyl-Linolensäure und eine Kontrollgruppe mit 2 Energie % Ethyl-Linolsäure fütterten, fanden keinen signifikanten Unterschied in der PGE_2 -Ausscheidung der beiden Gruppen. Sie zogen den Schluß, daß der endogene Arachidonsäurepool für die PGE_2 -Synthese durch die relativ hohe Gabe von Linolensäure unbeeinflusst blieb. So wäre es auch denkbar, daß in dem vorliegenden in-vivo Versuch der Vorrat an Arachidonsäure im Körper zu groß war, um durch eine nur zwei Wochen dauernde Linolensäurezufuhr von 8 Energieprozent beim Menschen so vermindert zu werden, daß die Synthese von PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ auch oder gerade in der Niere absinkt.

Der Versuchsablauf spielt sicher eine erhebliche Rolle bei der Bewertung der Ergebnisse (Tab.2). Bei Versuchsperson D folgte die FD I nicht auf FD III wie bei den anderen fünf Probanden, sondern auf die dem Ernährungsversuch vorausgehende freie Kost. Von dieser Versuchsperson erwartete man also am ehesten einer konventionellen Ernährung ohne Linolensäure entsprechende Werte, da bei ihr keine mindestens zwei Wochen dauernde Zufuhr der hemmenden Linolensäure vorausging. Die Werte der Versuchsperson D während FD I waren denn auch deutlich höher als die Ausscheidung unter FD III oder wenn FD I nach FD III verabreicht wurde (Abb.11 und 12).

Dies spricht ebenso für eine im Versuchsablauf vor der Zufuhr von FD III bereits während FD II mit einer Linolensäurezufuhr von 4 Energieprozent (Tab.1) stattgefundene Verminderung der PG_2 -Bildung wie die folgenden Resultate.

Versuchsperson A und B begannen mit FD III, die damit direkt auf die freie Kost folgte. Bei den anderen vier Versuchspersonen kam die FD III dagegen erst nach der FD II (Tab.2), während der bereits eine zweiwöchige Gabe von 4 Energie % Linolensäure erfolgt war. Die Synthese von PGE_2 und $PGF_{2\alpha}$ bei Versuchsperson A und B übertraf die der anderen vier Versuchspersonen während FD III signifikant (Abb.11 und 12). Dies weist auch daraufhin, daß die Verminderung der PG_2 -Ausscheidung bereits während der FD II mit 4 Energieprozent Linolensäure erfolgte.

Die auf freie Kost folgende Formeldiät zeigte also höhere Meßwerte als die gleiche im Versuchsablauf später verabreichte Formeldiät, denn freie Kost enthält so gut wie keine Linolensäure bzw. Eikosa-pentaensäure mit Ausnahme der Ernährung der Eskimos (6,20,21,94,95).

Dies entspricht dem von Adam (3) bei der Untersuchung des Linolensäureeinflusses auf die PG-Bildung gefundenen geringeren Anstieg der PG-Bildung bei Gabe von 20 Energie % Linolensäure auf freie Kost im Vergleich zur Gabe von 20 Energie % Linolensäure auf 4 Energie % Linolensäure.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Bei sechs gesunden weiblichen Versuchspersonen wurde die Prostaglandinbildung der Niere während der Aufnahme von drei isoenergetischen Formeldiäten mit Linolensäurezufuhr von 0 % (FD 4/0), 4 % (FD 4/4) und 8 % (FD 4/8) der Nahrungsenergie über jeweils zwei Wochen untersucht. Die Linolensäurezufuhr (4 Energie %), Fett-(30 Energie %), Kohlenhydrat-(55 Energie %) und Eiweißzufuhr (15 Energie %) war bei allen Formeldiäten konstant. Gemessen wurde die Ausscheidung von PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ im 24-h-Urin mit einem Radioimmunoassay an den Tagen 1,3,5,10,12 und 14 der FD 4/8 und an den Tagen 1 und 2 der FD 4/0.

Vor der Auswertung des Ernährungsversuchs mußte die Sensitivität des Radioimmunoassays auf die zu erwartenden Prostaglandinkonzentrationen im Urin eingestellt werden, und die Meßmethode bezüglich Präzision, Spezifität und Validität überprüft werden. Standardkurven mit hoher Meßgenauigkeit im Bereich der zu messenden PG-Konzentrationen ergaben sich bei einer Antikörperbindung von 40-45 % für PGE_2 und 30-40 % für $\text{PGF}_{2\alpha}$.

Die Ausscheidung von PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ blieb während der Formeldiät III mit einer Linolensäurezufuhr von 8 Energie % gleich, im Mittel 410 ± 56 ng/d PGE_2 , 990 ± 78 ng/d $\text{PGF}_{2\alpha}$ und änderte sich abgesehen von $\text{PGF}_{2\alpha}$ auch an den ersten beiden Tagen der Formeldiät I ohne Linolensäurezufuhr nicht. Eine verminderte Bildung von PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ während der Linolensäurezufuhr von 4 Energie % fand sich beim Vergleich mit den Werten unter freier Kost.

F. TABELLEN 1-15

Formeldiät	I	II	III
	Energie %		
Linolsäure	4	4	4
Linolensäure	0	4	8

Tab. 1: Anteile (% der Nahrungsenergie) der Linol- und Linolensäure in den drei Formeldiäten.

Formeldiäten			Versuchspersonen
- III -	- I -	- II -	A B
- I -	- II -	- III -	C D
- II -	- III -	- I -	E F

0 → 2 → 4 → 6 Wochen

Tab. 2: Zuteilung der Versuchspersonen A-F zu den drei Formeldiäten. Je zwei Versuchspersonen bekamen eine Formeldiät für zwei Wochen.

Nährstoff- quelle	g	Nährstoff	g	Kalorien [kcal]	E%	en% F%	KH%
Hyperprotidine FD I, II, III	40,0	Protein (92%)	37,0	152	15		
Maltodextrin FD I, II, III	70,0	Kohlenhy- drat (94,5%)	136,0	557			55
Pudding	80,0	" (87,0%)					
Fettgemisch FD I, II, III ⇒ Tab.3	32,0	Fett	32,0	297		30	
				1000	15	30	55

Zutaten der Formeldiäten

1 l H₂O

2 g NaCl

2 g KCl

0,3g Cholesterin

Tab. 3: Für die drei Formeldiäten verwendete Nährstoffe und deren Nährstoffgehalt (in Gramm, kcal und Energieprozent).

Lösungs- mittel- gemische	Volumenanteile				
	Benzol		Ethylacetat	Methanol	
S - 1	60	:	40		→ PGA/B
S - 4	60	:	40	:	2 → PGE
S - 3	60	:	40	:	10 →
S - 2	60	:	40	:	20 → PGF

Tab. 4: Lösungsmittelgemische für die Prostaglandintrennung mit der Kieselgelsäule (80).

	Prostaglandine			Prosta- cyclin	Throm- boxan	Leuko- trien C ₄
	E ₂	F _{2α}	D ₂			
Gefäßtonus			↓	↓	↑	↑
Nierendurchblutung	↑	↓				
Natriumausscheidung	↑	↓				
Thrombocytenaggregation			↓	↓↓	↑↑	
Bronchialtonus	↓	↑	↑	↓	↑	↑↑
Darmtonus						↑
Uteruskontraktion	↑	↑				
Blutdruck	↓	↑		↓	↑	
Magensaftsekretion	↓			↓		
Reninfreisetzung	↑	↓	↑	↑		
Lipolyse	↓					
Gefäßpermeabilität	(↑)					↑

Tab. 5: Physiologische Wirkungen einiger Metaboliten der Arachidonsäure (1,57).

Öl bzw. Fett	Linolsäure	Linolensäure	Arachidonsäure
	g/100g Fett		
Kokosfett	1		
Distelöl	70,5	1	
Baumwollsaamenöl	48	1	
Maiskeimöl	55,7	1	1
Olivenöl	9	0,8	
Palmöl	8	0,4	
Palmkernöl	3,8		
Erdnußbutter	33		
Sesamöl	44,5	0,5	
Sojaöl	53	7,2	
Sonnenblumenöl	62,5	0,5	
Schweineschmalz	7	0,5	
Butter	2	1	1
Muttermilchfett	10,6	0,4	0,8

Tab. 6: Gehalt verschiedener Öle bzw. Fette an mehrfach ungesättigten Fettsäuren (Linolsäure, Linolensäure und Arachidonsäure) (74).

U _{PGE₂} [pg/ml]		Versuchspersonen						
		A	B	C	D	E	F	X ± S.D.
Versuchstag	1	235 [*]	238	324 [*]	164	123 [*]	122	201 ± 79
	3	556	541 [*]	807	126 [*]	276	164 [*]	333 ± 205
	5	595	(1603)	424 [*]	95	66 [*]	384	313 ± 227
	10	205	(1612 [*])	530	168 [*]	148	228 [*]	256 ± 156
	12	134 [*]	538	533 [*]	269	115 [*]	666	376 ± 234
	14	251	288 [*]	599	447 [*]	76	309	328 ± 178

Tab. 7: PGE₂ (pg/ml) im Urin der sechs Versuchspersonen (A-F) gemessen an den angegebenen Versuchstagen während der 14-tägigen Formeldiät III.

* : Proben mit Wiedergewinnungskontrolle.

() : Werte wurden wegen zu großer Abweichung nicht berücksichtigt bei der Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung.

U _{PGF_{2α}} [pg / ml]		Versuchspersonen						
		A	B	C	D	E	F	X ± S.D.
Versuchstag	1	836	652*	744	675*	397	342	608±196
	3	491* (1006)		578*	866	950*	323	642±262
	5	952 (1359*)		435	586*	380	989*	668±286
	10	554*	521	600*	704	534	702	602±82
	12	494 (1554*)		531	1194*	284	570*	615±342
	14	543	988	737* (1067)		563*	531	672±195

Tab. 8: PGF_{2α} (pg/ml) im Urin der sechs Versuchspersonen (A-F) gemessen an den angegebenen Versuchstagen während der 14-tägigen Formeldiät III.

* : Proben mit Wiedergewinnungskontrolle.

() : Werte wurden wegen zu großer Abweichung nicht berücksichtigt bei der Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung.

U _{PGE₂} [pg/ml]		Versuchspersonen						
		A	B	C	D	E	F	X ± S.D.
Versuchstag	1	177 *	331	906 *	973	89 *	91	172 ± 114
	2	40	84 *	153	447	290	433 *	241 ± 176

Tab. 9: PGE₂ (pg/ml) im Urin der sechs Versuchspersonen (A-F) gemessen an den ersten beiden Versuchstagen während der FD I.

* : Proben mit Wiedergewinnungskontrolle.

U _{PGF_{2α}} [pg/ml]		Versuchspersonen						
		A	B	C	D	E	F	X ± S.D.
Versuchstag	1	239	926 *	750	(1331*)	434	363 *	542 ± 286
	2	300 *	923	594 *	904	487	615	637 ± 241

Tab. 10: PGF_{2α} (pg/ml) im Urin der sechs Versuchspersonen (A-F) gemessen an den ersten beiden Versuchstagen während der FD I.

* : Proben mit Wiedergewinnungskontrolle.

() : Wert wurde wegen zu großer Abweichung nicht berücksichtigt bei der Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung.

U _{PGE₂} · V [ng / d]		Versuchspersonen						
		A	B	C	D	E	F	X ± S.D.
Versuchstag	1	294 [*]	538	337 [*]	200	232 [*]	311	319 ± 119
	3	(1229)	514 [*]	(1420)	384 [*]	326	350 [*]	392 ± 85
	5	952 [*]	(1138)	560	197	104 [*]	226	408 ± 349
	10	423	(3628 [*])	774	318 [*]	224	664 [*]	481 ± 232
	12	195 [*]	834	373	460	175 [*]	(1133)	407 ± 267
	14	337	525 [*]	581	327 [*]	155	804 [*]	454 ± 229

Tab. 11: PGE₂ (ng/d) im 24-Std. Urin der sechs Versuchspersonen (A-F) gemessen an den angegebenen Versuchstagen während der 14-tägigen Formeldiät III.

* : Proben mit Wiedergewinnungskontrolle.

() : Werte wurden wegen zu großer Abweichung nicht berücksichtigt bei der Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung.

U _{PGF_{2α}} ·V [ng/d]		Versuchspersonen						
		A	B	C	D	E	F	X ± s.d.
Versuchstag	1	1045	1475*	774	823*	736	868	954 ± 277
	3	1085*	1525	1017*	(2641)	1121*	688	1087 ± 299
	5	1525	965*	574	1218*	597	583*	911 ± 398
	10	1142*	1172	876*	1338	808	(2043)	1067 ± 219
	12	720	(2408*)	371	2042*	435	969*	907 ± 678
	14	727	1799	715*	779	1155*	895	1012 ± 418

Tab. 12: PGF_{2α} (ng/d) im 24-Std. Urin der sechs Versuchspersonen (A-F) gemessen an den angegebenen Versuchstagen während der 14-tägigen Formeldiät III.

* : Proben mit Wiedergewinnungskontrolle.

() : Werte wurden wegen zu großer Abweichung nicht berücksichtigt bei der Berechnung von Mittelwert und Standardabweichung.

U _{PGE₂} ·V [ng/d]		Versuchspersonen						
		A	B	C	D	E	F	X ± S.D.
Versuchstag	1	336*	328	517* (1352)	188*	277	329 ± 120	
	2	60	141*	375	852*	623 (1272*)	410 ± 330	

Tab. 13: PGE₂ (ng/d) im 24-Std. Urin der sechs Versuchspersonen (A-F) gemessen an den ersten beiden Versuchstagen während der Formeldiät I.

* : Proben mit Wiedergewinnungskontrolle.

() : Werte wurden wegen zu großer Abweichung nicht berücksichtigt.

U _{PGF_{2α}} ·V [ng/d]		Versuchspersonen						
		A	B	C	D	E	F	X ± S.D.
Versuchstag	1	455	916*	427	1850*	892	1103*	940 ± 521
	2	441*	1541	1456*	1717	1047*	1809	1334 ± 512

Tab. 14: PGF_{2α} (ng/d) im 24-Std. Urin der sechs Versuchspersonen (A-F) gemessen an den ersten beiden Versuchstagen während der Formeldiät I.

* : Proben mit Wiedergewinnungskontrolle.

Reagenzglas [ml]	$^3\text{HPGE}_2$ $^3\text{HPGF}_{2\alpha}$	Standard	Gelphos	Antikörper	Kohle - Dextran-S.
1	0,1	—	0,2	—	—
2	↓	—	0,2	—	1,0
3 } 4 }		—	0,1	0,1	
5		—	0,1	0,1	
6		0,1 (1000pg)	—	↓	
7		(333pg)	—		
8		(111pg)	—		
9		(37pg)	—		
10	↓	(12pg)	—	↓	↓
		(4pg)	—		

Tab. 15: Pipettierschema zum Erstellen einer Standardkurve (Testansatz)
für die Bestimmung von PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$.

G. ABBILDUNGEN 1-14

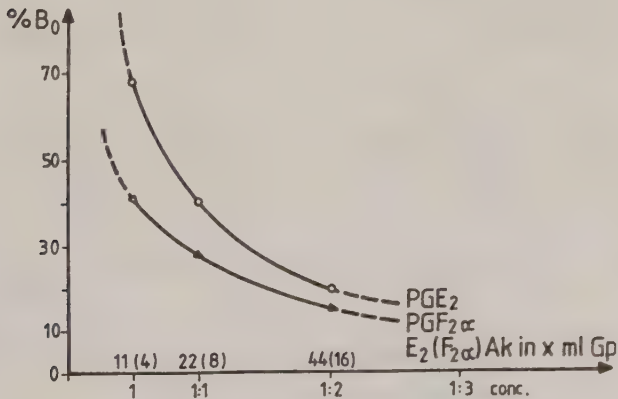
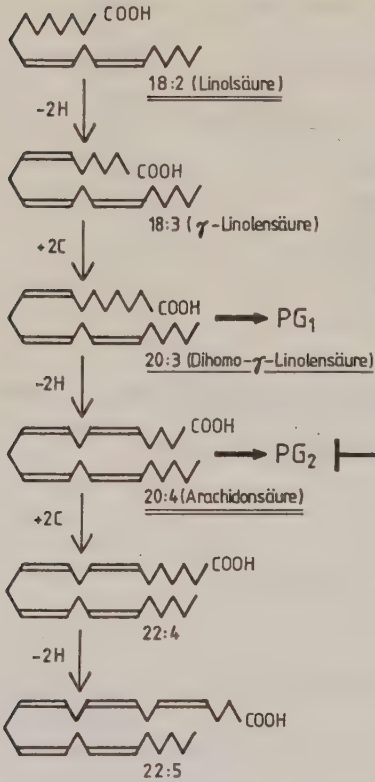


Abb. 1: Verdünnungsreihe des Antikörpers mit Gelphos, um die prozentuale Bindung des Antikörpers an das Antigen zu messen.
Für die Messungen wurde ein binding von 30-50% verwendet (% B₀).

ω 6-Fettsäuren



ω 3-Fettsäuren

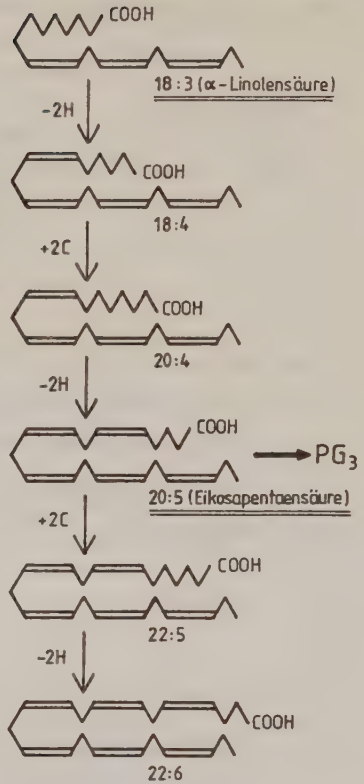


Abb. 2: Stoffwechsel der Linol- und Linolensäure im Säugetierorganismus (1,5,64,99).

$\text{PG}_{1,2,3}$ = Prostaglandine mit 1,2 oder 3 Doppelbindungen in den Seitenketten.

 Darstellung der kompetitiven Hemmung durch Eikosapentaensäure.

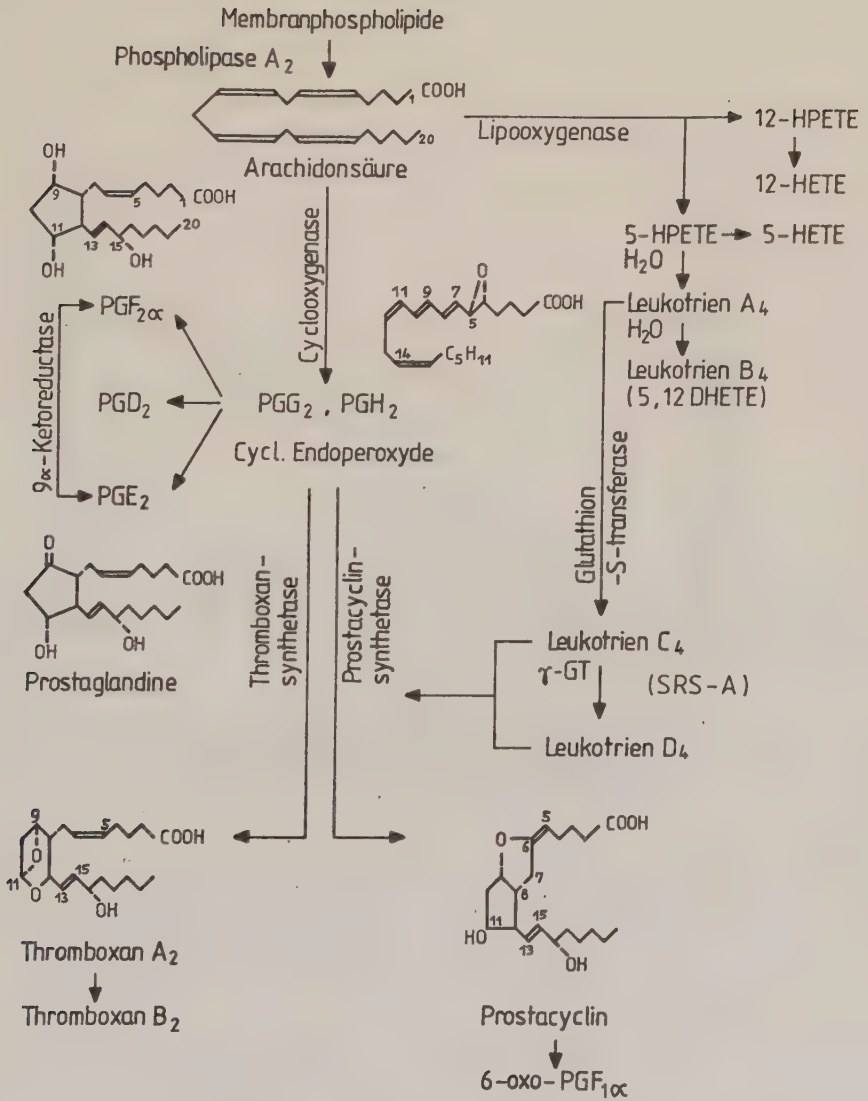


Abb. 3: Eikosanoidbildung aus Eikosatetraensäure, welche aus Membranphospholipiden durch die Aktivität der Phospholipase A₂ freigesetzt wird (8,62).

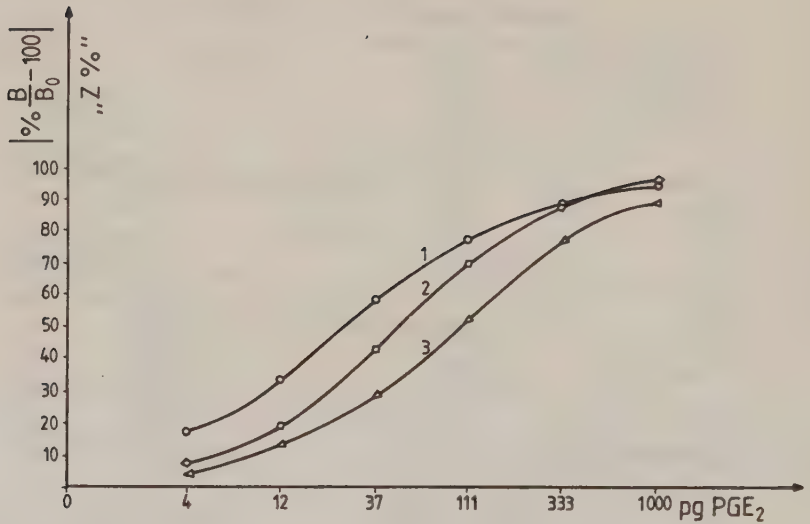


Abb. 4: Abhängigkeit der Lage der Standardkurve vom binding:
bei ansteigendem binding (Kurve 1: 41% (○),
(Kurve 2: 43% (◊),
(Kurve 3: 45% (◄))
ist der Steilanstieg der Kurve in einen höheren pg-Be-
reich verschoben. (PGE_2).

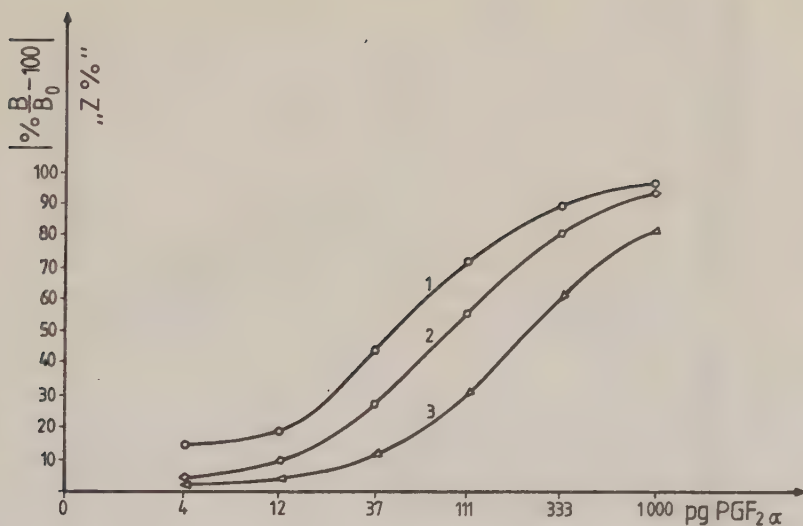


Abb. 5: Abhängigkeit der Lage der Standardkurve vom binding:

bei ansteigendem binding (Kurve 1: 32% (○),

(Kurve 2: 34% (◇),

(Kurve 3: 39% (◄))

ist der Steilanstieg der Kurve in einen höheren pg-
Bereich verschoben (PGF₂α).

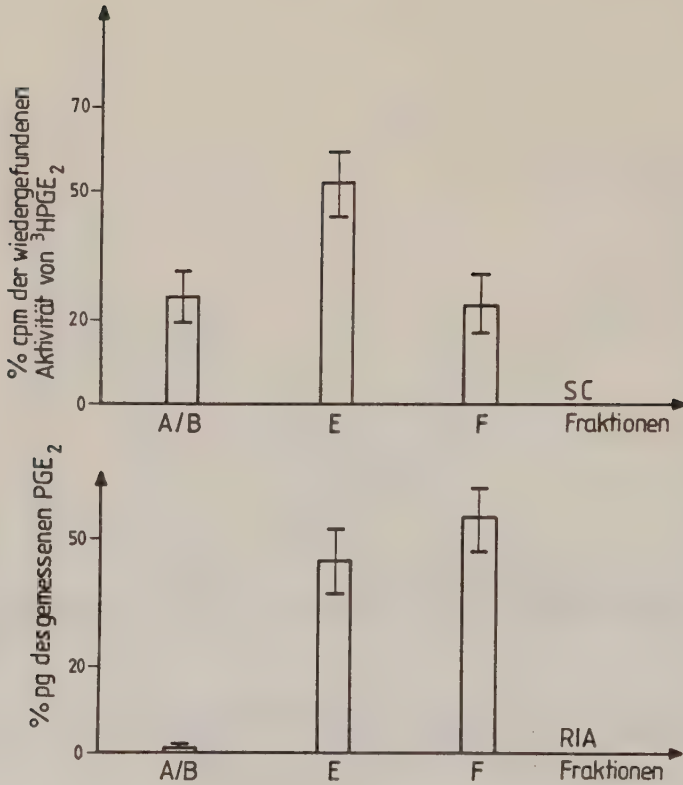


Abb. 6: Abb. 7: Verteilungsvergleich der Prostaglandin-Fractionen im Urin zwischen säulenchromatographischer Trennung (Anteil der Radioaktivität in den drei Fraktionen nach Zugabe von $100\mu\text{l } ^3\text{HPGE}_2$ (1000 cpm) zum Urin) und der Messung der drei getrennten Fraktionen mit dem PGE_2 -Antikörper im Radioimmunoassay (Anteil der Menge von Prostaglandin E_2 in den drei getrennten Fraktionen) ($n=4$).

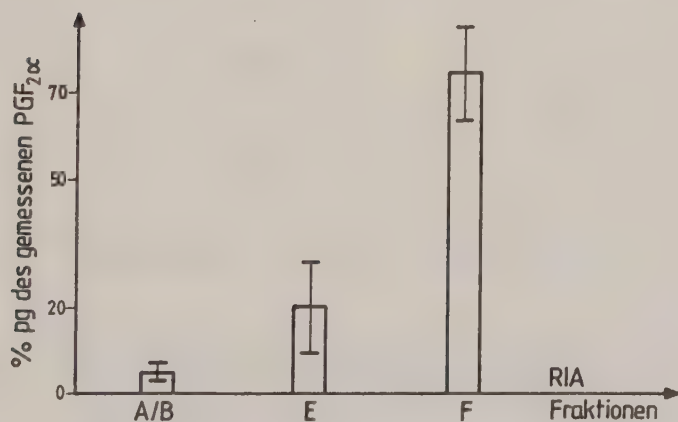
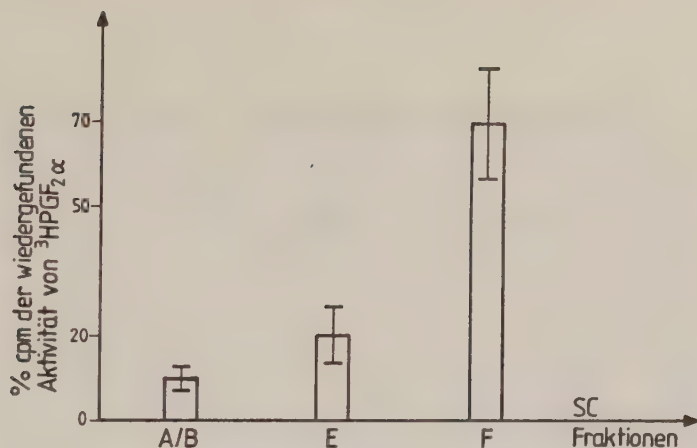


Abb. 8 Abb. 9: Verteilungsvergleich der Prostaglandin-Fractionen im Urin zwischen säulenchromatographischer Trennung (Anteil der Radioaktivität in den drei Fraktionen nach Zugabe von $100\mu\text{l } ^3\text{HPGF}_{2\alpha}$ (1000 cpm) zum Urin und der Messung der drei getrennten Fraktionen mit dem $\text{PGF}_{2\alpha}$ - Antikörper im Radioimmunoassay (Anteil der Menge von Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ in den drei getrennten Fraktionen) (n=4).

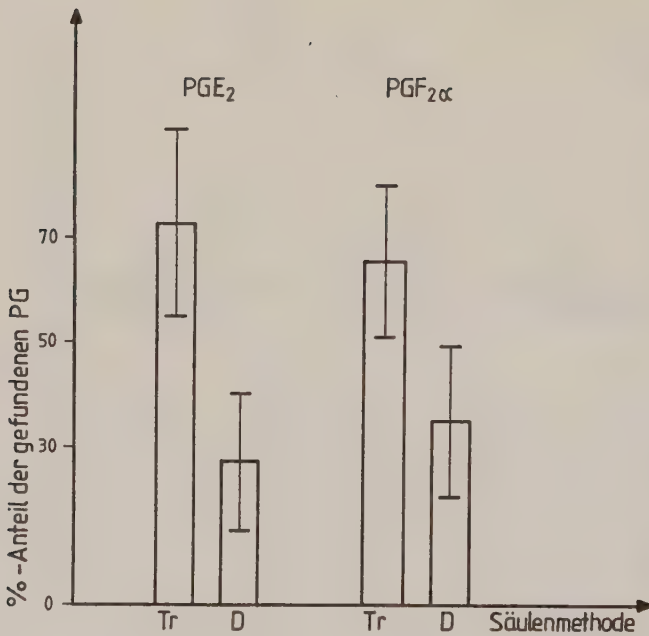


Abb. 10: Vergleich zwischen Elution der Prostaglandine in drei Fraktionen (Trennung (Tr) mit den Lösungsmittelgemischen S-1, S-4, S-2 nach Tab.4) und der Elution aller Prostaglandine (Durchwaschen (D) mit S-2) mit nachfolgender radioimmunologischer Bestimmung der Prostaglandine (n=3).

Angegeben ist das prozentuale Gewichtsverhältnis der radioimmunologisch gemessenen Prostaglandine.

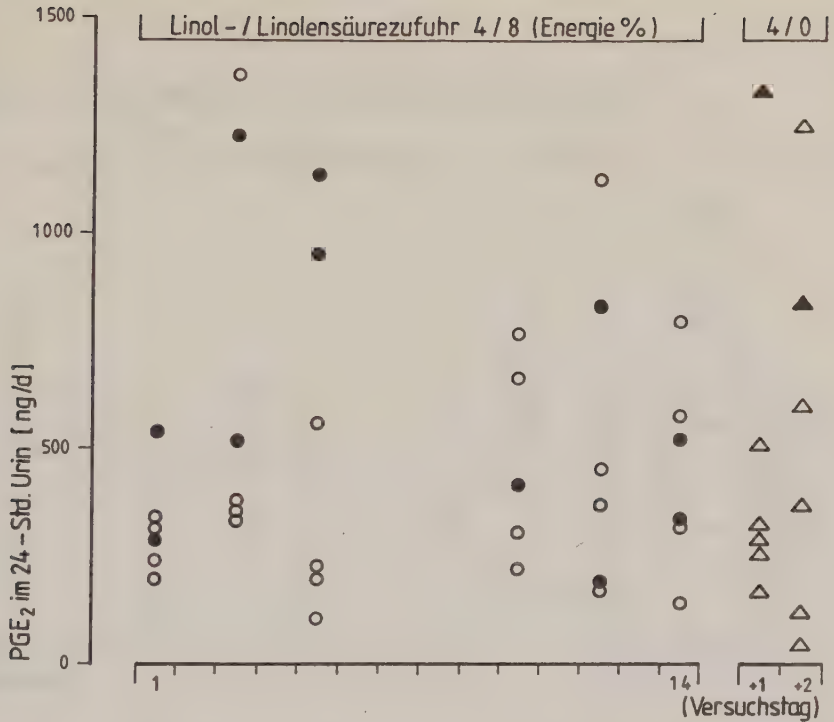


Abb. 11: Ausscheidung von PGE₂ im 24-Std. Urin von sechs gesunden weiblichen Versuchspersonen unter dem Einfluß von Formeldiäten mit einer vierzehntätigen Linolensäurezufuhr von 8 Energie % und an den ersten beiden Tagen einer FD-Periode unter Linolensäurezufuhr von 0 Energie %.

○ = Versuchspersonen mit FD III (8 Energie % Linolensäure).

△ = Versuchspersonen mit FD I (0 Energie % Linolensäure).

● = Versuchspersonen, bei denen die FD III auf freie Kost folgte.

▲ = Versuchsperson, bei der die FD I auf freie Kost folgte.

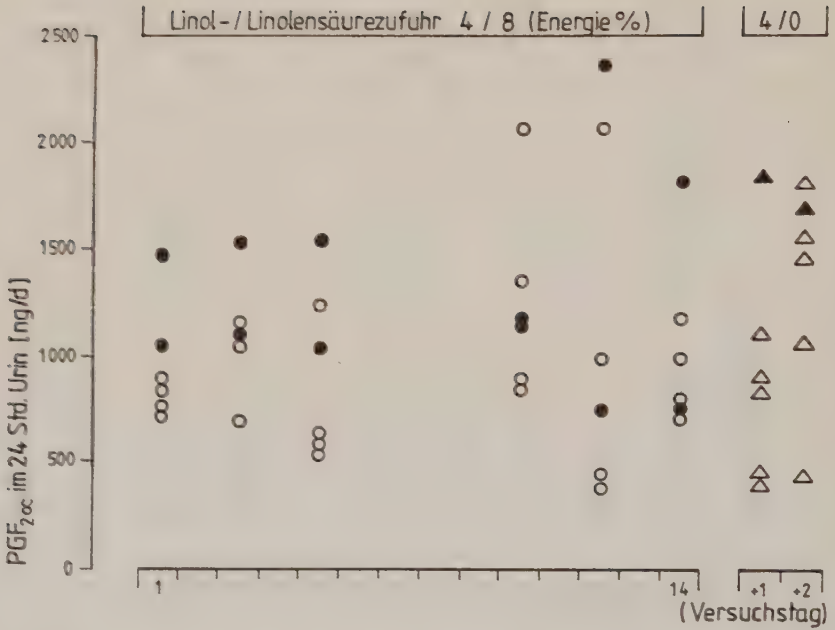


Abb. 12: Auscheidung von PGF_{2α} im 24-Std. Urin von sechs gesunden weiblichen Versuchspersonen unter dem Einfluß von Formel-
diäten mit einer vierzehntägigen Linolensäurezufuhr von
8 Energie % und an den ersten beiden Tagen einer FD-Peri-
ode unter Linolensäurezufuhr von 0 Energie %.

○ = Versuchspersonen mit FD III (8 Energie % Linolensäure).

△ = Versuchspersonen mit FD I (0 Energie % Linolensäure).

● = Versuchspersonen, bei denen die FD III auf freie Kost
folgte.

▲ = Versuchsperson, bei der die FD I auf freie Kost folgte.

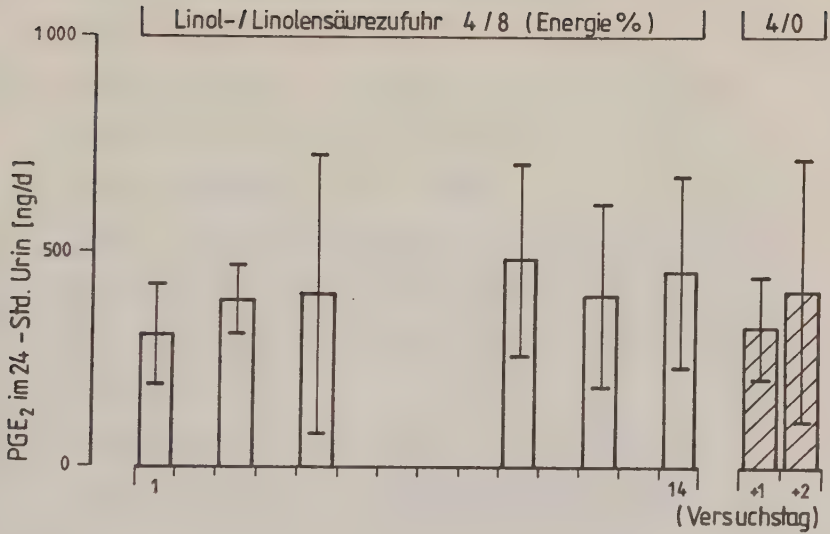


Abb. 13: PGE₂ ($\bar{x} \pm$ S.D.) im 24-Std. Urin von sechs gesunden weiblichen Versuchspersonen unter dem Einfluß von Formeldiäten mit einer vierzehntägigen Linolensäurezufuhr von 8 Energie % (FD III) und an den ersten beiden Tagen während einer Linolensäurezufuhr von 0 Energie % (FD I, schraffierte Säulen).

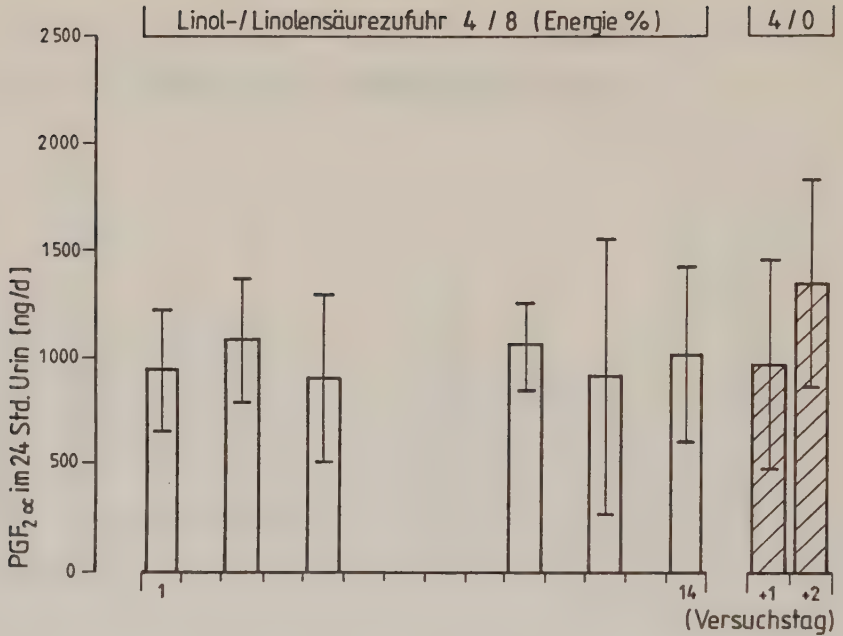


Abb. 14: PGF_{2α} ($\bar{x} \pm$ S.D.) im 24-Std. Urin von sechs gesunden weiblichen Versuchspersonen unter dem Einfluß von Formeldiäten mit einer vierzehntägigen Linolensäurezufuhr von 8 Energie % (FD III) und an den ersten beiden Tagen während einer Linolensäurezufuhr von 0 Energie % (FD I, schraffierte Säulen).

H. LITERATURVERZEICHNIS

- (1) ADAM, O.: Prostaglandine und andere Stoffwechselprodukte essentieller Fettsäuren. Med.Klin. 6: 182-189 (1983).
- (2) ADAM, O.; WOLFRAM, G.; ZÖLLNER, N.: Einfluß der Linsäurezufuhr auf die Nierenfunktion beim Menschen. Ernährungsumschau 29:222 (1982).
- (3) ADAM, O.; WOLFRAM, G.; ZÖLLNER, N.: Prostaglandin formation in man during intake of different amounts of linoleic acid in formula diets. Ann. Nutr. Metab. 26:315-323 (1982).
- (4) ADAM, O.; WOLFRAM, G.; ZÖLLNER, N.: Prostaglandinumsatz, Natrium-, Wasser- und Kreatininausscheidung sowie art. Blutdruck in Abhängigkeit von der Linsäurezufuhr. Verh. dtsh. Ges. inn. Med. 87:986-987 (1981).
- (5) ÅNGGÅRD, E.; ÖLIW, E.: Formation and metabolism of prostaglandins in the kidney. Kidney Int. 19:771-780 (1980).
- (6) BANG, H.O.; DYERBERG, J.: Lipid metabolism and ischemic heart disease in Greenland Eskimos. Adv. Lipid Res. 3:1-22 (1980).
- (7) BECKMAN, M.L.; ZEHR, J.E.: Partition of PGE between renal venous plasma and urine during renal ischemia. Prostaglandins 9:721-726 (1975).

- (8) BEHRMAN, H.R.: Radioimmunoassay of prostaglandins. *Physiologist* 14:110 (1971).
- (9) BERGSTRÖM, S.; DANIELSON, H.; SAMUELSSON, B.: The enzymatic formation of prostaglandin E₂ from arachidonic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 90:207 (1964).
- (10) BERGSTRÖM, S.; RYHAGE, R.; SAMUELSSON, B.; SJOVALL, J.: The structures of prostaglandins E₁, F₁ and F_{1α}. *J. biol. Chem.* 238:3555-3564 (1963).
- (11) BERGSTRÖM, S.; SJOVALL, J.: The isolation of prostaglandin E from the sheep prostate glands. *Acta chem. scand.* 14: 1701-1705 (1960).
- (12) BRENNER, R.R.; PELUFFO, O.: Regulation of unsaturated fatty acid biosynthesis. I. Effect of unsaturated fatty acid of 18 carbons on the microsomal desaturation of linoleic acid to γ -linolenic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 176: 471-479 (1969).
- (13) BUDDEKE, E.: Prostaglandine; in Buddeke, *Grundriß der Biochemie* (de Gruyter, Berlin 1977).
- (14) CALDWELL, B.V.; BURSTEIN, S.; BROCK, W.A.; SPEROFF, L.: Radioimmunoassay of the F prostaglandins. *J. clin. Endocr.* 33:171 (1971).

- (15) CIBATTONI,G.; PUGLIESE,F.; PINCA,E.; CINOTTI,G.A.;
DE SALVO,A.; SATTA,M.A.; PATRONO,C.: Biologic and
methodologic variables affecting urinary prosta-
glandin measurement. Adv. Prostaglandin Thromboxane
Res. 6:207 (1980).
- (16) CULP,B.R.; TITUS,B.G.; LANDS,W.E.M.: Inhibition
of prostaglandin biosynthesis by eicosapentaenoic
acid. Prostaglandins and Medicine 3: 269-278 (1979).
- (17) DRAY,F.; CHARBONNEL,B.: Dosage radioimmunologique
des prostaglandines F_{α} et E_1 dans le plasma péri-
phérique de l' homme normal. Les Prostaglandines,
Colloque de L' Inserm (1973).
- (18) DRAY,F.; CHARBONNEL,B.; MACLOUF,F.: Radioimmuno-
assay of prostaglandins F_{α} , E_1 and E_2 in human
plasma. Europ. J. Clin. Invest. 5: 311-318 (1975).
- (19) DÜSING,R.; HERRMANN,R.; GLÄNZER,K.; VETTER,H.:
OVERLACK,A.; KRAMER,H.J.: Renal prostaglandins
and water balance: studies in normal volunteer
subjects and in patients with central diabetes
insipidus. Clin. Science 61:61-67 (1981).
- (20) DYERBERG,J.; BANG,H.O.: Haemostatic function
and platelet- polyunsaturated fatty acids in
Eskimos. Lancet 2:433-435 (1979).

- (21) DYERBERG, J.; BANG, H.O.; STOFFERSEN, E.; MONCADA, S.; VANE, J.R.: Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis ? *Lancet* 2: 117-119 (1978).
- (22) EULER, U.S. VON : Über die spezifische blutdrucksenkende Substanz des menschlichen Prostata- und Samenblasensekretes. *Klin. Wschr.* 14: 1182-1183(1935).
- (23) EULER, U.S. VON: Zur Kenntnis der pharmakologischen Wirkungen von Nativsekreten und Extrakten männlicher accessorischer Geschlechtsdrüsen. *Arch. exp. Path. Pharm.* 175:78-84 (1934).
- (24) FORTH, W.; HENSCHLER, O.; RUMMEL, W.: Prostaglandine; in Forth, Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie (Bibliogr. Inst., Mannheim 1980).
- (25) FRIEDMAN, Z.; SEYBERTH, H.; LAMBERTH, E.L.; OATES, J.; Decreased prostaglandin-E turnover in infants with essential fatty acid deficiency. *Pediat. Res.* 12: 711-714 (1978).
- (26) FRIEDMAN, Z.; SEYBERTH, H.; FRÖLICH, J.C.; OATES, J.: Effects of dietary variation in linoleic acid content on the major urinary metabolites of the E prostaglandins (PGE-M) in infants. *Adv Prostaglandin Thromboxane Res.* 8:1799-1805(1980).

- (27) FRÖLICH ,J.C.; WILSON,T.W.; SWEETMAN,B.J.;
SMIGEL,M.; NIES,A.S.; CARR,K.; WATSON,J.T.;
OATES,J.A.: Urinary prostaglandins: Identification and origin. J. Clin. Invest.
55: 763-770 (1975).
- (28) GERNOT,P.: Hormone; in Gernot, Klinische
Chemie (Rathgeber, München 1977).
- (29) GILL,J.R.; FRÖLICH ,J.C.: Bartter's syndrome.
Am. J. Med. 61:43 (1976).
- (30) GRANSTRÖM,E.: Chemistry of prostaglandins
and thromboxanes. Adv. Prostaglandin Thrombo-
xane Res. 13:1-8 (1977).
- (31) GRANSTRÖM,E.; HAMBERG,M.; HAMSSON,G.;
KINDAHL,H.: Chemical instability of 15-keto-
13,14-dihydro-PGE₂: The reason for low assay
reliability. Prostaglandins 19:933 (1980).
- (32) GRANSTRÖM,E.; KINDAHL,H.: Assay methods for
prostaglandins and thromboxanes.
Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.6:69(1980).
- (33) GRANSTRÖM,E.; KINDAHL,H.: Radioimmunoassay
for prostaglandin metabolites.
Adv. Prostaglandin Thromboxane Res. 1:87(1978).

- (34) GRUNDL, W.: Der Einfluß der Linolsäurezufuhr auf die renale Prostaglandinbildung. Med.Diss., Universität München, München(1984).
- (35) GRYGLEWSKI, R.J.; SALMON, J.A.; UBATUBA, F.B.; WAETHERLY, B.C.; MONCADA, S.; VANE, J.R.: Effects of all cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid and PGH₂ on platelet aggregation. Prostaglandins 18: 453 (1979).
- (36) HAMBERG, M.; SAMUELSSON, B.: Detection and isolation of an endoperoxide intermediate in prostaglandin biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70:899 (1973).
- (37) HAMBERG, M.; SAMUELSSON, B.: On the metabolism of prostaglandins E₁ and E₂ in man. J.Biol.Chem. 246: 6713-6721 (1971).
- (38) HAMBERG, M.; SAMUELSSON, B.: Prostaglandins in human seminal plasma. J.Biol.Chem. 241: 257-265 (1966).
- (39) HAMBERG, M.; SVENSSON, J.; SAMUELSSON, B.: Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70:2994(1975).

- (40) HANSEN, A.E.; STEWART, R.A.; HUGHES, G.;
SODERHJELM, L.: The relation of linoleic
acid to infant feeding. *Acta Pediat.*
51:1-41 (1962).

- (41) HANSEN, H.S.; JENSEN, B.: Urinary excretion
of PGE₂ in essential fatty acid-deficient
rats and in ethyl-linolenate-fed rats.
Fifth International Conference Prostaglandins:
699 (1982).

- (42) HARPER, H.A.; LÖFFLER, G.; PETRIDES, P.E.;
WEISS, L.: Stoffwechsel der Lipide; in Harper,
Löffler, *Physiologische Chemie* (Springer,
Berlin 1975).

- (43) HASSAM, A.G.; CRAWFORD, M.A.: The differential
incorporation of labelled linoleic acid,
gamma-linolenic, dihomo-gamma-linolenic and
arachidonic acids into the developing rat brain.
J. Neurochem. 27:967-968 (1976).

- (44) HOLMAN, R.T.: Nutritional and metabolic inter-
relationships between fatty acids. *Federation*
Proc. 23: 1062 (1964).

- (45) HORTON, R.; DUNN, M.J.: Symposium issue: Prosta-
glandins and the kidney. *Mineral. Electrolyte*
Metab. 6:5-9 (1981).

- (46) HUBBARD, W.C.; WATSON, J.T.: Determination of 15-keto-13,14-dihydro-metabolites of PGE₂ and PGF_{2α} in plasma using high performance liquid chromatography-mass spectrometry. Prostaglandins 12:21 (1976).
- (47) HWANG, D.H.: Influence of dietary polyunsaturated fatty acids on the level of serum prostaglandins. Ph.D. Thesis, Colorado State University (1974).
- (48) HWANG, D.H.; CARROLL, A.E.: Decreased formation of prostaglandins derived from arachidonic acid by dietary linolenate in rats. Am. J. Clin. Nutr. 33: 590-597 (1980).
- (49) HWANG, D.H.; KINSELLA, J.E.: The effects of trans-trans-methyl-linoleate on the concentration of prostaglandins and their precursors in rat. Prostaglandins 17:543(1979);
- (50) HWANG, D.H.; MATHIAS, M.M.; DUPONT, J.; MEYER, D.L.: Linoleate enrichment of diet and prostaglandin metabolism in rats. J. Nutr. 105:995 (1975).
- (51) JAFFE, B.M.; PARKER, C.W.: Radioimmunoassay for prostaglandins. Science 171:494 (1971).

- (52) JAFFE,B.; BEHRMAN,H.R.; PARKER,C.W.:
Radioimmunoassay measurement of prosta-
glandins E,A and F in human plasma.
J. Clin. Invest. 52:398 (1973).
- (53) JENNRICH,P.: Ein Stoff für viele Leiden.
Die Zeit 43:66 (1982).
- (54) JONES,R.L.; CAMMOCK,S.; HORTON,E.W.:
Partial purification and properties of
cat plasma- prostaglandin A isomerase.
Biochim. Biophys. Acta 280:588-595 (1972).
- (55) JOHNSON,H.T.; MIDDLEDITCH,B.S.: Prosta-
glandins in human seminal fluid: two
novel compounds. Science 187:1093-1101 (1975).
- (56) KAHN,D.; ANDRIEU,J.M.; DRAY,F.: Evaluation
of some binding parameters of hapten-anti-
body complexes using dextran-coated char-
coal to separate the bound and the free
fractions. Immunochemistry 11 (1975).
- (57) KARLSON,P.: Hormone; in Karlson, Kurzes
Lehrbuch der Biochemie (Thieme, Stuttgart 1980).
- (58) KIBBEY,W.; BROWN,D.; MINTON,J.P.: Chromato-
graphic patterns of prostaglandins using
different lots of silicic acid.
Prostaglandins 13:1023-1032 (1977).

- (59) KURZROK ,R.; LIEB,C.: Biochemical studies on human semen. II.Action of semen on human uterus. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 28:268-272 (1930).
- (60) LEE,J.B.; PATAK,R.V.; MOOKERJEE,B.K.: Renal prostaglandins and the regulation of blood pressure and sodium and water homeostasis. Am. J. Med. 60:798 (1976).
- (61) LIJNEN,P.J.; VERSCHUEREN,L.J.; FAGARD,R.H.; AMERY,A.K.: Urinary prostaglandins E_2 and $F_{2\alpha}$ excretion in normal subjects. Arch. Int. de Phys. et de Biochim. 88:4(1980).
- (62) MC CASHE,J.; MEYER,D.L.; DUPONT,J.: Radioimmunoassay of prostaglandins E_1 , E_2 and $F_{2\alpha}$ in unextracted plasma, serum and myocardium. Prostaglandins 12:471 (1976).
- (63) MC GIFF,J.C.; CROWSHAW,K.; ITSKOVITZ,H.D.: Prostaglandins and renal function. Fed. Proc. 33:39 (1974).
- (64) MEAD,J.F.: The metabolism of the polyunsaturated fatty acids; in Holman, Progress in the chemistry of fats and other lipids vol.9,pp.161-192 (Pergammon Press, New York 1966).

- (65) MOHRHAUER, H.; HOLMAN, R.T.: The effect of dietary EFA upon composition of polyunsaturated fatty acids in depot fat and erythrocytes of the rat.
J. Lipid Res. 4:346 (1963).
- (66) MOHRHAUER, H.; HOLMAN, R.T.: The effect of dose level of EFA upon fatty acid composition of the rat liver.
J. Lipid Res. 4:151 (1963).
- (67) MOHRHAUER, H.; RAHM, J.J.; SEUFERT, J.; HOLMAN, R.T.: Metabolism of linoleic acid in relation to dietary monoenoic fatty acids in rats. J. Nutr. 91:521 (1967).
- (68) MONCADA, S.; GRYGLEWSKI, R.; BUNTING, S.; VANE, J.: An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation.
Nature 263: 663-665 (1976).
- (69) MORRIS, H.; SHERMAN, N.; SHEPPERDSON, F.T.: Variables associated with radioimmunoassay of prostaglandins in plasma.
Prostaglandins:21:771-788 (1981).
- (70) MORRISON, A.R.: Prostaglandins and the kidney. Am. J. Med. 69:171-173 (1980).

- (71) MUIRHEAD, E.E.; KINMAN, J.W.: Production of renomedullary prostaglandins by interstitial renomedullary cells grown in tissue culture. *Circ. Res.* 30:161-172 (1972).
- (72) NEEDLEMAN, P.; RAZ, A.; MINKES, M.S.; FERENDELLE, J.A.; SPRECHER, H.: Triene prostaglandins: prostacyclin and thromboxane biosynthesis and unique biological properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76:944-948 (1979).
- (73) NEEDLEMAN, P.; WHITAKER, M.O.; WYCHE, A.; WATERS, K.; SPRECHER, H.; RAZ, A.: Manipulation of platelet aggregation by prostaglandins and their fatty acid precursors: pharmacological basis for a therapeutic approach. *Prostaglandins* 19: 165-181 (1980).
- (74) NESTLE DIÄT GMBH: Ernährung heute; In Nestle, Einführung in die Ernährungslehre und Diätetik (München 1975).
- (75) NICHAMAN, M.Z.; OLSON, R.E.; SWEETLEY, C.C.: Metabolism of linoleic acid 1-¹⁴C in normolipemic and hyperlipemic humans fed linoleate diets. *Am. J. clin. Nutr.* 20: 1070-1083 (1967).
- (76) NUGTEREN, D.H.: The determination of prostaglandin metabolites in human urine. *J. Biol. Chem.* 250: 2808-2812 (1975).

- (77) NUGTEREN,D.H.; VAN DORP,D.A.; BERGSTRÖM,S.:
Absolute configuration of prostaglandins.
Nature 212:38-39 (1966).
- (78) NUGTEREN,D.H.; VON EVERT,W.C.; SOETING,W.J.;
SPUY,J.H.: Effect of different amounts of
linoleic acid in the diet on the excretion
of urinary prostaglandin metabolites in the
rat. Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.
8:1793-1796 (1980).
- (79) OELZ,O.; SEYBERTH,H.W.; KNAPP,H.R.; SWEET-
MAN,B.J.; OATES,J.A.: Effects of feeding
ethyl-dihomo- γ -linolenate on prostaglandin
biosynthesis and platelet aggregation in
the rabbit. Biochim. Biophys. Acta 431:
268-277 (1976).
- (80) ORCZYK,G.P.; BEHRMAN,H.R.: Ovulation blo-
ckade by aspirin and indomethacin-in vivo
evidence for a role of prostaglandins in
gonadotropic secretion. Prostaglandins 1:
3 (1972).
- (81) ORMSBY,J.W.; SCHNATZ,J.D.; WILLIAMS,H.H.:
The incorporation of linoleic 1-¹⁴C acid
in human plasma and adipose tissue.
Metabolism 12: 812-820 (1963).

- (S2) PATRONO, C.; WENNMANN, A.; CIRATTONI, G.;
NOWAK, J.; PUOLIESE, F.; CINOTTI, G.A.:
Evidence for an extrarenal origin of
urinary prostaglandin E_2 in healthy men.
Prostaglandins 18:623 (1979).
- (S3) PONG, S.S.; LEVINE, L.: Biosynthesis of
prostaglandins in rabbit renal cortex.
Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol.
13:115-123 (1976).
- (S4) RAMWELL, R.W.; DANIELS, E.G.: Chromato-
graphy of the prostaglandins. Lipid
Chromatographic Analysis 2:332 (1968).
- (S5) RAMWELL, R.W.; DANIELS, E.G.: Chromato-
graphy of the prostaglandins. Lipid
Chromatographic Analysis 2:313-344 (1969).
- (S6) SATOH, S.; ZIMMERMAN, B.G.: Renal effect
of meclofenamate in presence and absence
of superfusion bioassay.
Am. J. Physiol. 230: 711 (1976).
- (S7) SCHERER, B.: Radioimmunologische Bestimmung
primärer Prostaglandine im Urin.
Med.Habil., Universität München, S.22-50 (1980).

- (88) SCHERER,B.; SCHNERMANN,J.; SOFRONIEV,M.; WEBER,P.: PG-analysis in urine of humans and rats by different radioimmunoassays: effect on PG-excretion by PG-synthetase inhibitors,laparotomy and furosemide. Prostaglandins 15:255-265 (1978).
- (89) SCHERER,B.; SIESS,W.; WEBER,P.: Radio-immunological and biological measurement of prostaglandins in rabbit urine: decrease of PGE₂ excretion at high NaCl intake. Prostaglandins 13:1127 (1977).
- (90) SCHERHAG,R.; DÜSING,R.; KRAMER,H.J.: Einfluß einer alimentären Zufuhr von ω -3-Fettsäuren auf arteriellen Blutdruck und vaskuläre Prostacyclinsynthese der Ratte. Ernährungsumschau 29: 222 (1982).
- (91) SCHOENE,N.W.; REEVES,V.B.; FERETTI,A.: Effects of dietary linoleic acid on the biosynthesis of PGE₂ and PGF_{2 α} in kidney medullae in spontaneously hypertensive rats. Adv. Prostaglandin Thromboxane Res. 8: 1791-1792 (1980).

- (92) SELINGER,Z.; HOLMAN,R.T.: The effects of trans,trans-linoleate upon the metabolism of linoleate and linolenate and the positional distribution of linoleate isomers in liver lecithin. *Biochim. Biophys. Acta* 106: 56 (1965).
- (93) SIESS,W.; SCHERER,B.; BÖHLIG,B.; ROTH,P.; KURZMANN,I.; WEBER,P.: Platelet membrane fatty acids, platelet aggregation and thromboxane formation during a mackerel diet . *Lancet* 1:441-444 (1980).
- (94) SINCLAIR,H.M.: Diet and heart disease. *Br.Med.J.* 1602 (1977).
- (95) SINCLAIR,H.M.: The relative importance of essential fatty acids of the linoleic and linolenic families: studies with an Eskimo diet. *Progr. Lipid Res.* 20: 897-899 (1981).
- (96) SINZINGER,H.: Prostaglandine in der Inneren Medizin. *Münch. med. Wschr.* 27:651-654 (1983).
- (97) SINZINGER,H.: Prostaglandine-körpereigene Steuerhormone. *Münch. med. Wschr.* 46: 1009-1100 (1982).

- (98) SORS,H.; MACLOUF,S.; PRADELLES,P.; DRAY,F.:
The use of iodinated tracers to a sensitive
radioimmunoassay of 13-14-dihydro-15-keto-
prostaglandin $F_{2\alpha}$. Biochim. Biophys. Acta
486,3:533-564 (1977).
- (99) SPRECHER,H.: In Kunare, Holman, Polyunsatu-
rated fatty acids,pp.1-18 (Academic Press,
New York 1977).
- (100) SUN,F.F.; TAYLOR,B.M.; MC GUIRE,J.C.;
WONG,P.Y.K.: Metabolism of prostaglandins
in the kidney. Kidney Int. 19: (1981).
- (101) TAI,H.H.; HOLLANDER,C.S.: Biosynthesis of
prostaglandins in rabbit kidney medulla.
Biochem. J. 154:257-264 (1976).
- (102) TAN,S.J.; SWEET,P.; MULROW,P.J.: Impaired
renal production of prostaglandin E_2 : a
newly identified lesion in human essential
hypertension. Prostaglandins 15:
139-147 (1978).
- (103) TAYLOR,P.L.; KELLY,R.W.: 19-hydroxylated
E prostaglandins as the major prostaglandins
of human semen. Nature 250:665-673 (1974).

- (104) TEN HOOR, F.; DE DECKERE, E.A.M.; HADDEMAN, E.;
HORNSTRA, G.; QUADT, J.F.A.: Dietary manipulation of prostaglandin and thromboxane synthesis in heart, aorta and blood platelets of the rat. Adv. Prostaglandin Thromboxane Res. 8:1771-1781 (1980).
- (105) THIELE, O.W.: Bedarf des Menschen an essentiellen Fettsäuren. Z. Allg. Med. 58:
1329-1331 (1982).
- (106) THIELE, O.W.: Zur Nomenklatur und Systematik ungesättigter Fettsäuren; in Thiele, Lipide, Isoprenoide mit Steroiden (Thieme, Stuttgart 1979).
- (107) THOMAS, C.M.; VAN DEN BERG, K.J.; DE KONING-
GANS, H.J.; LEGUIN, R.M.: Radioimmunoassay for prostaglandins. Technical validation of prostaglandin $F_{2\alpha}$ measurements in human plasma using sephadex G-25 gel filtration. Prostaglandins 15:839 (1978).
- (108) TINOCO, J.; ENDEMANN, G.; HINCENBERGS, J.;
MEDWADOWSKI, B.; MILJANICH, P.; WILLIAMS, M.A.: Effects of linoleic acid deficiency on the fatty acid patterns in plasma and liver cholesteryl esters, triglycerides and phospholipids in female rats. J. Nutr. 110:1497-1505 (1980).

- (109) VAITUKAITIS, J.; ROBBINS, J.B.; NIESCHLAG, E.; ROSS, T.: A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. *J. clin. Endocr.* 33:988 (1971).
- (110) VAN DORP, D.A.; BEERTHUIS, R.K.; NUGTEREN, H.; VONKEMAN, H.: The biosynthesis of prostaglandins. *Biochim. Biophys. Acta* 90:204 (1964).
- (111) VAN ORDEN, D.E.; FARLEY, D.B.; CLANCEY, C.J.: Radioimmunoassay of PGE and an approach to the specific measurement of PGE₁. *Prostaglandins* 13:437-453 (1977).
- (112) VERGROESEN, A.J.; DE BOER, J.: Quantitative und qualitative Effekte mehrfach ungesättigter und anderer Fettsäuren in der menschlichen Diät; in Zöllner, *Polyenfettsäuren*, vol.22 (Steinkopff, Darmstadt 1971).
- (113) WELFHÖNER, H.-H.: Das Prostaglandinsystem; in Wellhöner, *Allgemeine und systematische Pharmakologie und Toxikologie* (Springer, Berlin 1982).
- (114) WHITAKER, M.O.; WYCHE, A.; FITZPATRICK, F.; SPRECHER, H.; NEEDLEMAN, P.: Triene prostaglandins: prostaglandin D₃ and eicosapentaenoic acid as potential antithrombotic substances. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76:5919-5923 (1979).

- (115) WILLIS,A.L.: Nutritional and pharmacological factors in eicosanoid biology. Nutr. Rev. 8:289 (1981).
- (116) ZÖLLNER,,N.; ADAM,O.; WOLFRAM,G.: The influence of linoleic acid intake on the excretion of urinary prostaglandin metabolites. Res. exp. Med. 175:149-153(1979).

DANKSAGUNG

Herrn Professor Zöllner danke ich dafür, daß ich in seinem Hause und seinem Labor arbeiten durfte.

Herrn Professor Wolfram danke ich für die freundliche Überlassung des Dissertationsthemas.

Herrn Privatdozent Adam möchte ich für seine väterliche Hilfe sowie sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit danken.

Herrn Dr. Reiter gilt mein Dank für wertvolle Anregungen und für die gute Zusammenarbeit im Isotopenlabor.

LEBENS LAUF

Hans-Peter Schwemlein

- 1957 Geboren am 6.10. in München
 Eltern: Peter Schwemlein, Verwaltungs-
 angestellter und Ehefrau Anna geb.
 Lechner, Hausfrau
- 1964-1968 Besuch der Grundschule St. Georg
 in Freising
- 1968-1977 Besuch des math.-naturwissenschaftl.
 Josef-Hofmiller-Gymnasiums
 in Freising
- 24.6.1977 Abitur / Bayer. Begabtenstipendium
- 1977-1983 Studium der Medizin an der Ludwig-
 Maximilians-Universität in München
- 28.8.1979 Ärztliche Vorprüfung
- 24.11.1983 Ärztliche Prüfung
- 1.12.1983 Approbation als Arzt
- 15.10.1984 Beginn der Tätigkeit als Assistenzarzt
 an der Med. Abteilung des Kreis-
 krankenhauses Freising

